



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **SÍNTESE DE NITROSOTIÓIS PARA EXPERIMENTAÇÃO *EX VIVO* E *IN VIVO* RELACIONADA COM A RESISTÊNCIA À INSULINA**

Trabalho submetido por  
**Kelly Stefany Tuna Frade**  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Doutor Francisco Jorge Caldeira**

**Outubro de 2013**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta monografia os meus pais, ao meu irmão e ao Alexandre, por todo o apoio incondicional que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

## **AGRADECIMENTOS**

Embora o projeto de investigação descrito nesta monografia seja, por sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, tornaram possível a elaboração desta investigação levada a cabo.

Sendo assim, agradeço especialmente ao Prof. Doutor Jorge Caldeira por ter aceite ser meu orientador de investigação, pela sua generosidade e partilha do seu saber que tanto contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço igualmente, o apoio dos investigadores com os quais trabalhei, sendo de destacar a Dr.<sup>a</sup> Fátima Martins, a Dr.<sup>a</sup> Joana Gaspar e o Dr. Ricardo Afonso, investigadores no departamento de fisiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa.

Agradeço, ainda, ao departamento de química da FCT-UNL e ao ISCSEM por me terem proporcionado excelentes condições de trabalho, que sem as quais não teria sido possível a concretização do trabalho de investigação desenvolvido.

Por último mas não menos importante, um muito obrigada ao meu colega, amigo e namorado Alexandre Rego, por todo apoio, espírito de equipa e sentido crítico partilhado no decorrer de todas as investigações realizadas.

## **RESUMO**

O presente projeto de investigação pretende propor que a Substância Hepática Sensibilizadora de Insulina (HISS) consiste num dos produtos de degradação da insulina (cadeia A/B) nitrosilados, e que a enzima interveniente na formação de tais produtos é a Proteína Dissulfito Isomerase (PDI) presente nos hepatócitos. Adicionalmente sugere-se a ligação dos nitrosilados de insulina à albumina.

Com vista a tentar comprovar esta hipótese, a investigação efetuada teve o intuito de confirmar a existência de PDI ao nível dos hepatócitos, determinar a sua atividade e analisar os produtos de degradação originados. Outro dos objetivos foi efetuar a produção de nitrosotióis de cadeia A e B para posterior administração *ex vivo* e *in vivo*, e respetiva quantificação do potencial terapêutico.

Neste sentido, foram realizados diversos ensaios. Assim, numa fase inicial procedeu-se à monitorização da degradação enzimática da insulina por via *in vitro* com recurso à PDI purificada e a lisados de hepatócitos de rato recorrendo à técnica de turbidimetria. Seguidamente, foi realizada a análise dos produtos originados pela degradação da insulina efetuada pela PDI purificada através de eletroforese SDS-PAGE. Posteriormente, procedeu-se à separação química da cadeia A e B da insulina com posterior produção de nitrosotióis. Por último, estes produtos foram administrados a miotubos de rato e a ratos Wistar e o seu potencial terapêutico quantificado através da medição da captação de 2-deoxi-glucose marcada com trítio radioativo e através de sucessivos testes RIST, respetivamente.

Com efeito, os resultados desta investigação permitiram reforçar as ilações feitas pelos demais autores quanto à presença e atividade da PDI ao nível dos hepatócitos em relação à insulina, e para além disso confirmaram a suspeita inicial de que um dos derivados de insulina nitrosilados tem potencial efeito terapêutico ao nível da resistência à insulina apesar de não parecer estar relacionado com a estrutura da HISS.

**Palavras-chave:** Cadeia A nitrosilada; Cadeia B nitrosilada; HISS; PDI.

## **ABSTRACT**

This research project proposes that the Hepatic Insulin Sensitizing Substance (HISS) is a degradation nitrosylated product of insulin (A/B chain) and the enzyme responsible for the formation of such products is the Protein Disulphite Isomerase (PDI) present on hepatocytes. Additionally it is suggested the binding of insulin nitrosylated derivatives to albumin.

In order to try to prove this hypothesis, the research was conducted with the aim to confirm the existence of PDI at the level of hepatocytes, determine its activity and analyze its degradation products. Another objective was the production of nitrosothiols from A and B chains for subsequent *ex vivo* and *in vivo* administration, and the respective quantification of therapeutic potential.

In this regard, various tests were performed. Thus, at the initial stage the enzymatic *in vitro* degradation of insulin with purified PDI and rat hepatocytes lysates was monitored using the turbidimetry technique. Next, the analysis of the products generated by purified PDI's insulin degradation was performed using SDS -PAGE. Afterwards, the chemical separation of insulin A and B chains took place, with subsequent production of nitrosothiols. Finally, these products were administered to rat myotubes and Wistar rats and their therapeutic potential quantified by measuring the uptake of 2-deoxy-glucose labeled with radioactive tritium and through successive RIST tests, respectively.

Indeed, the results of this research support the conclusions made by other authors for the presence and activity of PDI at the hepatocytes level in relation to insulin, and also confirmed the initial suspicion that one of insulin nitrosylated derivatives has potential therapeutic effect at the insulin resistance level although it does not seem related to the HISS structure.

**Keywords:** Nitrosylated A Chain; Nitrosylated B Chain; HISS; PDI.

## **ÍNDICE GERAL**

<b>A. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1. ENQUADRAMENTO DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO E DA MONOGRAFIA .....	10
2. MECANISMOS FISIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLUCOSE .....	11
3. INSULINA .....	19
4. SUBSTÂNCIA HEPÁTICA SENSIBILIZADORA DA INSULINA (HISS) .....	36
5. DIABETES MELLITUS: UMA ANOMALIA PATOLÓGICA DA HOMEOSTASE DA GLUCOSE .....	38
6. ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENSIBILIDADE À INSULINA .....	43
7. DA RESISTÊNCIA À INSULINA À DIABETES MELLITUS TIPO 2: PONTO DA SITUAÇÃO ..	49
8. HIPÓTESE DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO E OBJETIVOS ESTABELECIDOS .....	51
<b>B. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
1. CONJUNTURA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO .....	52
2. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA INSULINA POR VIA <i>IN VITRO</i> E RESPECTIVA ANÁLISE ..	52
2.1. CATÁLISE ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> ENTRE A <u>PDI</u> E A INSULINA .....	53
2.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA ENTRE <u>LISADOS DE HEPATÓCITO</u> E A INSULINA .....	54
2.3. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ORIGINADOS PELA CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	56
3. PRODUÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FISIOLÓGICO NO ÂMBITO DA TEORIA DA HISS .....	59
3.1. PRODUÇÃO DE NITROSILADOS DE INSULINA DE CADEIA ÚNICA .....	59
3.2. EXPERIMENTAÇÃO <i>EX VIVO</i> E <i>IN VIVO</i> DOS NITROSILADOS DE INSULINA DE CADEIA ÚNICA .....	61
<b>C. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
1. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA INSULINA POR VIA <i>IN VITRO</i> E RESPECTIVA ANÁLISE ..	67
2. PRODUÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FISIOLÓGICO NO ÂMBITO DA TEORIA DA HISS .....	83
<b>D. CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>93</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Metabolismo da glucose no hepatócito. ....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática da cadeia A e cadeia B da insulina, e respetiva conformação em monómero. ....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática de alguns dos eventos moleculares que ocorrem durante a biossíntese da insulina. ....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b> – Esquematização do processo de secreção de insulina pelas células $\beta$ do pâncreas. ....	<b>24</b>
<b>Figura 5</b> – Representação do recetor da insulina. ....	<b>26</b>
<b>Figura 6</b> – Resumo da cascata de sinalização da insulina. ....	<b>27</b>
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática dos cinco domínios característicos da PDI e a respetiva conformação da enzima. ....	<b>31</b>
<b>Figura 8</b> – Representação dos diversos mecanismos envolvidos no processamento de substratos proteicos a partir da PDI. ....	<b>33</b>
<b>Figura 9</b> – Esquematização da cinética de redução do centro ativo da PDI.....	<b>34</b>
<b>Figura 11</b> – Progressão da Diabetes Mellitus tipo 2. ....	<b>43</b>
<b>Figura 12</b> - Principais alterações no desenvolvimento da Diabetes mellitus tipo 2. ....	<b>50</b>
<b>Figura 13</b> - Hipótese do projeto de investigação levado a cabo. ....	<b>51</b>
<b>Figura 14</b> – Resultado final de uma das cirurgias levadas a cabo para a administração dos compostos em interesse.....	<b>64</b>
<b>Figura 15</b> - Interação <i>in vitro</i> entre a PDI proveniente do fígado digerido <i>in vivo</i> com recurso a 50mg de colagenase com a insulina. ....	<b>74</b>
<b>Figura 16</b> – Gel de SDS-PAGE relativo às amostras de concentrações diferentes de PDI. ....	<b>76</b>
<b>Figura 17</b> - Resultado obtido após catálise enzimática efetuada pela PDI ao nível do seu substrato insulina. ....	<b>79</b>
<b>Figura 18</b> - Gel de SDS-PAGE correspondente às amostras da reação enzimática realizada pela PDI (0,4 mg/ml) em relação à insulina durante 72 horas. ....	<b>79</b>
<b>Figura 19</b> – Representação esquemática do possível polímero formado após a reação enzimática que decorreu durante 72 horas. ....	<b>82</b>
<b>Figura 20</b> – Esquematização do processo da quantificação da captação de 2-DG pelas células em cultura. ....	<b>82</b>

## **ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Principais propriedades das isoformas dos transportadores de glucose facilitativos (GLUT1-12 e HMIT (transportador de mio-inositol associado ao H <sup>+</sup> ))......	<b>12</b>
<b>Tabela 2</b> – Principais propriedades dos isotipos de transportadores de glucose dependentes de sódio (SGLT1-3).....	<b>13</b>
<b>Tabela 3</b> – Tabela representativa da ordem de colocação das amostras da experiência 2.1.a) nos poços do gel.....	<b>58</b>
<b>Tabela 4</b> – Tabela representativa da ordem de colocação das amostras da experiência 2.1.b) nos poços do gel. ....	<b>58</b>
<b>Tabela 5</b> – Constituição de cada um dos derivados de insulina – Padrões e Produtos (com e sem NO, e com e sem albumina). ....	<b>60</b>
<b>Tabela 6</b> – Dados, complementares ao gráfico 4, referentes à análise e tratamento do gel da figura 16.....	<b>76</b>
<b>Tabela 7</b> – Dados referentes aos cálculos efetuados de acordo com a reta de calibração do gráfico 4.....	<b>77</b>
<b>Tabela 8</b> – Hipotéticas combinações entre as moléculas em estudo e os respectivos pesos moleculares. ....	<b>77</b>
<b>Tabela 9</b> – Dados, complementares ao gráfico 5, referentes à análise e tratamento do gel da figura 18.....	<b>80</b>
<b>Tabela 10</b> – Dados referentes aos cálculos efetuados de acordo com a reta de calibração do gráfico 5.....	<b>80</b>
<b>Tabela 11</b> – Hipotéticas combinações entre as moléculas em estudo e os respectivos pesos moleculares.....	<b>81</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina	<b>IL-1 e 6</b>	Interleucina 1 e 6
<b>2-DG</b>	2-Deoxi-Glucose	<b>iNO</b>	Óxido Nítrico sintetase Indutível
<b>DiE-GSSG</b>	Glutatião Dieosinado	<b>IRS</b>	Substratos de Resposta a Insulina
<b>DLS</b>	Dispersão Dinâmica da Luz	<b>JNK</b>	Quinase N-terminal do c-Jun
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetracético	<b>MIS</b>	Sensibilização à Insulina pela Refeição
<b>EGTA</b>	Ácido Tetracético de Etilenoglicol	<b>NFkB</b>	Fator Nuclear-kB
<b>eNO</b>	Óxido Nítrico sintetase Endotelial	<b>nNO</b>	Óxido Nítrico sintetase Neuronal
<b>GIP</b>	Péptido Insulinotrópico dependente de Glucose	<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>GLP-1</b>	<i>Glucagon Like Peptide</i> – 1	<b>PDI</b>	Proteína Dissulfito Isomerase
<b>GLUT</b>	Transportadores de Glucose Facilitativos	<b>PIK3</b>	3-Fosfatidilinositol
<b>Grb-2</b>	Proteína ligada ao Recetor do fator de Crescimento tipo 2	<b>RIST</b>	Teste Rápido de Sensibilidade à Insulina
<b>GSH</b>	Glutatião na forma reduzida	<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
<b>HIMT</b>	Transportador de Mio-Inositol associado ao H <sup>+</sup>	<b>SGLT</b>	Transportadores de Glucose dependentes de Sódio
<b>HISS</b>	Substância Hepática Sensibilizadora de Insulina	<b>SH2</b>	<i>Src-Homology-2</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	<b>SHP-2</b>	Proteína tirosina Fosfatase tipo 2
<b>IKK</b>	Inibidor da Quinase do fator nuclear-kB	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral

## **A. INTRODUÇÃO**

### **1. ENQUADRAMENTO DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO E DA MONOGRAFIA**

Nas últimas décadas tem-se vindo a verificar um contra-senso relativamente à saúde pública mundial, uma vez que no passado se constatava a emergência de doenças infecciosas ao passo que atualmente se tem assistido a um drástico aumento da prevalência de diversas doenças crónicas não infecciosas, nomeadamente a diabetes mellitus tipo 2, a hipertensão arterial e a obesidade (Zimmet, 2003). Neste contexto, a diabetes mellitus, por muito tempo considerada uma patologia de menor relevância na saúde mundial, é agora considerada uma das principais ameaças à saúde humana do século XXI, com repercussões patológicas, sociais e financeiras alarmantes (Zimmet, Alberti & Shaw, 2001; Nolan, Damm & Prentki, 2011; Fernandes 2011).

Posto isto, e atendendo a que pouco se sabe sobre as primeiras alterações celulares que ocorrem no organismo aquando do desenvolvimento desta doença, torna-se prioritário unir esforços para perceber os mecanismos fisiológicos da homeostase da glucose assim como os mecanismos celulares e moleculares que lhe estão subjacentes, para além de compreender as principais alterações metabólicas a que esta está sujeita (Rutter, 2000; Shulman, 2000; Fernandes, 2011). Assim, com uma perceção mais aprofundada da fisiopatologia da diabetes mellitus tipo 2, torna-se então possível descobrir novos tratamentos que consigam combater de forma eficaz esta pandemia no seu estado mais preliminar (Aronoff, Berkowitz, Shreiner & Want, 2004; Lutt, 2004; Lutt, 2007).

Tendo em conta o referido, torna-se então essencial proceder a uma contextualização introdutória de todos os pontos necessários para o esclarecimento do já conhecido quanto aos mecanismos fisiológicos subjacentes à homeostase da glucose como do que já se sabe sobre a diabetes mellitus tipo 2. Deste modo, será abordado neste capítulo em primeiro lugar os mecanismos fisiológicos envolvidos na manutenção da homeostase da glucose destacando-se a este nível duas hormonas - a insulina e a Substância Hepática Sensibilizadora de Insulina (HIS). Numa segunda instância será prestado um breve esclarecimento quanto à patologia em si, e de seguida serão dadas a conhecer as alterações fisiopatológicas da sensibilidade à insulina. Por fim e de forma a concluir este capítulo inicial, será efetuado um resumo de todos os fatores importantes que promovem a progressão da resistência à insulina até ao estabelecimento da diabetes mellitus tipo 2 propriamente dita.

## **2. MECANISMOS FISIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLUCOSE**

A glucose é a maior fonte energética das células eucariotas e desempenha, portanto, um papel fulcral no metabolismo e na homeostase celular, regulando desde a transcrição genética, atividades enzimáticas, secreção hormonal e atividade neuronal (Scheepers, Joost & Schurmann, 2004; Thorens & Mueckler, 2010).

Desta forma, a manutenção dos níveis plasmáticos de glucose entre o limiar de 70 a 100 mg/dl é uma função fisiológica vital para a manutenção da integridade energética de todo o organismo (Henriksen, Diamond-Stanic & Marchionne, 2011).

Atendendo a que a glucose em circulação é proveniente essencialmente da sua produção endógena ou da sua absorção gastrointestinal (após a ingestão de uma refeição), a manutenção da euglicémia é um processo complexo que envolve várias vias metabólicas e é finamente regulado por mecanismos neuronais e hormonais, que mantém contrabalançada a produção e a utilização deste monossacárido através do equilíbrio entre a taxa de entrada de glucose na circulação sanguínea e a sua taxa de captação pelos tecidos. (Giugliano, Ceriello & Esposito, 2008; Afonso, 2009; Chen, Tsai & Wong, 2010; Bano, 2013).

### **2.1. APORTE DA GLUCOSE PARA OS TECIDOS**

Um dos mecanismos de manutenção da homeostase da glucose é a sua captação a nível celular (Wood & Trayhurn, 2003). Neste âmbito, tendo em conta que a glucose é um composto hidrofílico e que a bicamada lipídica da membrana plasmática celular é impermeável a este tipo de moléculas, o seu aporte celular dependerá, então, de proteínas transportadoras, específicas para determinados tecidos (Scheepers et al., 2004). As proteínas transportadoras de glucose podem dividir-se estruturalmente e funcionalmente em duas famílias distintas, nomeadamente: transportadores de glucose facilitativos (GLUT) e transportadores de glucose dependentes de sódio (SGLT) (Zhao & Keating, 2007).

Os transportadores de glucose facilitativos (GLUT), como o próprio nome indica, promovem uma difusão facilitada da glucose (e outros monossacáridos) através de um processo não dependente de energia, que utiliza o gradiente de concentração do substrato para promover a sua difusão (Wood & Trayhurn, 2003). Neste âmbito, atualmente sabe-se que o genoma humano contém treze membros da família deste tipo de transportadores (GLUT1-12 e HMIT), que diferem entre si nas suas características

funcionais, particularmente quanto à especificidade do substrato, às suas propriedades cinéticas e quanto ao seu perfil de expressão nos mais variados órgãos (Scheepers et al., 2004; He, Liu X., Lui L., Chang & Fang, 2007).

Na tabela seguinte (tabela 1) encontra-se um resumo das principais características dos transportadores de glucose facilitativos.

**Tabela 1** – Principais propriedades das isoformas dos transportadores de glucose facilitativos (GLUT1-12 e HMIT (transportador de mio-inositol associado ao  $H^+$ )). *n.d.*, *não determinado*. Adaptada de Wood & Trayhurn (2003) e de Zhao & Keating (2007).

ISOFORMA	LOCALIZAÇÃO	DEPENDÊNCIA DE INSULINA?	MOLÉCULA(S) TRANSPORTADA(S)
GLUT1	Cérebro, eritrócitos, distribuição ubíqua nos tecidos	Não	Glucose
GLUT2	Pâncreas, fígado, intestino e rim	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT3	Cérebro	Não	Glucose (alta afinidade)
GLUT4	Músculo-esquelético, tecido adiposo e coração	Sim	Glucose (alta afinidade)
GLUT5	Intestino, rins e testículos	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT6	Baço, leucócitos e cérebro	Não	Glucose
GLUT7	Testículos, intestino grosso e colon	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
GLUT8	Testículos, cérebro, adipócitos e outros tecidos	Não	Glucose
GLUT9	Fígado e rins	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
GLUT10	Fígado e pâncreas	Não	Glucose
GLUT11	Coração e músculo-esquelético	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT12	Coração, próstata, glândula mamária e intestino delgado	Sim	<i>n.d.</i>
HMIT	Cérebro	<i>n.d.</i>	$H^+$ -mio-inositol

No que toca aos transportadores de glucose dependentes de sódio (SGLT), estes caracterizam-se pela utilização do gradiente eletroquímico de sódio ( $\text{Na}^+$ ) para transportar a glucose (e outros substratos) contra o seu gradiente de concentração (Bano, 2013). Ou seja, estas proteínas transportam o seu substrato em cooperação com um mecanismo de transporte ativo secundário, em que o gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  fornecido pela bomba sódio-potássio ATPase é utilizado para transportar a glucose para o espaço intracelular contra o seu gradiente de concentração, pelo que a glucose é co-transportada com  $\text{Na}^+$  na porção 2:1 (Wood & Trayhurn, 2003; Scheepers et al., 2004).

A família dos transportadores de glucose dependentes de sódio abrange seis (6) isotipos de SGLT (SGLT1-6), que à semelhança das isoformas de GLUT diferem entre si fundamentalmente quanto à sua localização, afinidade e capacidade de transporte, como se pode constatar pela tabela 2 (Wood & Trayhurn, 2003).

**Tabela 2** - Principais propriedades dos isotipos de transportadores de glucose dependentes de sódio (SGLT1-3). Adaptada de Zhao & Keating (2007).

ISOFORMA	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO, AFINIDADE E CAPACIDADE PROPOSTA
SGLT1	Rim e intestino (membrana apical do enterócito)	Alta afinidade e baixa capacidade para absorção de glucose (Scheepers et al., 2004)
SGLT2	Rim	Baixa afinidade e alta seletividade para absorção/reabsorção de glucose
SGLT3	Intestino delgado, rim e junção neuromuscular do músculo-esquelético	Baixa afinidade para glucose. Potencial glucosensor (Scheepers et al., 2004)

Quanto aos restantes membros dos transportadores de glucose dependentes de sódio - SGLT4, SGLT5 e SGLT6 – pouco se conhece relativamente à sua estrutura, localização e função, e por essa razão não foram incluídos na tabela atrás mencionada (Wood & Trayhurn, 2003).

## 2.2. METABOLISMO DA GLUCOSE

Uma vez dentro da célula a glucose é imediatamente fosforilada a 6-fosfato de glucose pela glucocinase, podendo ter vários destinos ou vias metabólicas depende do

tecido, das necessidades energéticas e do metabolismo de outras fontes de energia (Fernandes, 2011). Deste modo, o metabolismo da glucose é regulado em função de diversos fatores, sendo exemplo o estado prandial, que se apresenta como uma alteração fisiológica que afeta o equilíbrio das taxas de fluxo de glucose de e para a circulação sanguínea (Aronoff et al., 2004; Afonso, 2009).

### **2.2.1. ESTADO PÓS-ABSORTIVO E DE JEJUM**

No período pós-absortivo, isto é na ausência de ingestão de hidratos de carbono exógenos, o organismo consome glucose ao ritmo a que esta é sintetizada, em que 70% da sua forma basal é captada e utilizada pelos tecidos insulino-independentes, dos quais o cérebro é o maior consumidor (Ferrannini & Groop, 1989; Maggs, MacDonald & Nauck, 2008).

Neste contexto, durante a transição do estado alimentado (pós-prandial) para o jejum (período pós-absortivo), o fígado (cerca de 95%) e o rim (cerca de 5%) desempenham um papel fulcral na produção e libertação da glucose para a circulação<sup>1</sup>, sobretudo através da degradação de glicogénio (glicogenólise)<sup>2</sup> (Ekberg et al, 1999; Roden & Bernroider, 2003; Klover & Mooney, 2004). Com este efeito, numa situação de jejum, o 6-fosfato de glucose, resultante da glicogenólise hepática, é hidrolisado de forma a originar glucose, a qual pode ser exportada para a circulação sanguínea – efluxo hepático de glucose (figura 1) (Afonso, 2009).

Atendendo a que a glicogenólise hepática apenas assegura as necessidades de glucose periférica enquanto a quantidade de glicogénio armazenado assim o permitir<sup>3</sup>, para períodos de jejum mais prolongados a manutenção da glicémia faz-se essencialmente a partir de precursores gluconeogénicos (gluconeogénese) (Klover & Mooney, 2003; He et al., 2013).

O processamento da gluconeogénese é efetuado pelo fígado e pelo rim, e é caracterizado por um aumento na contribuição deste último para um patamar de 22-25% relativamente à entrada de glucose em circulação (Ekberg et al, 1999; Aronoff et al., 2004). Assim, no âmbito desta via metabólica, o fígado e o rim utilizam diversos substratos, nomeadamente: o lactato, glicerol, certos aminoácidos e o piruvato (figura

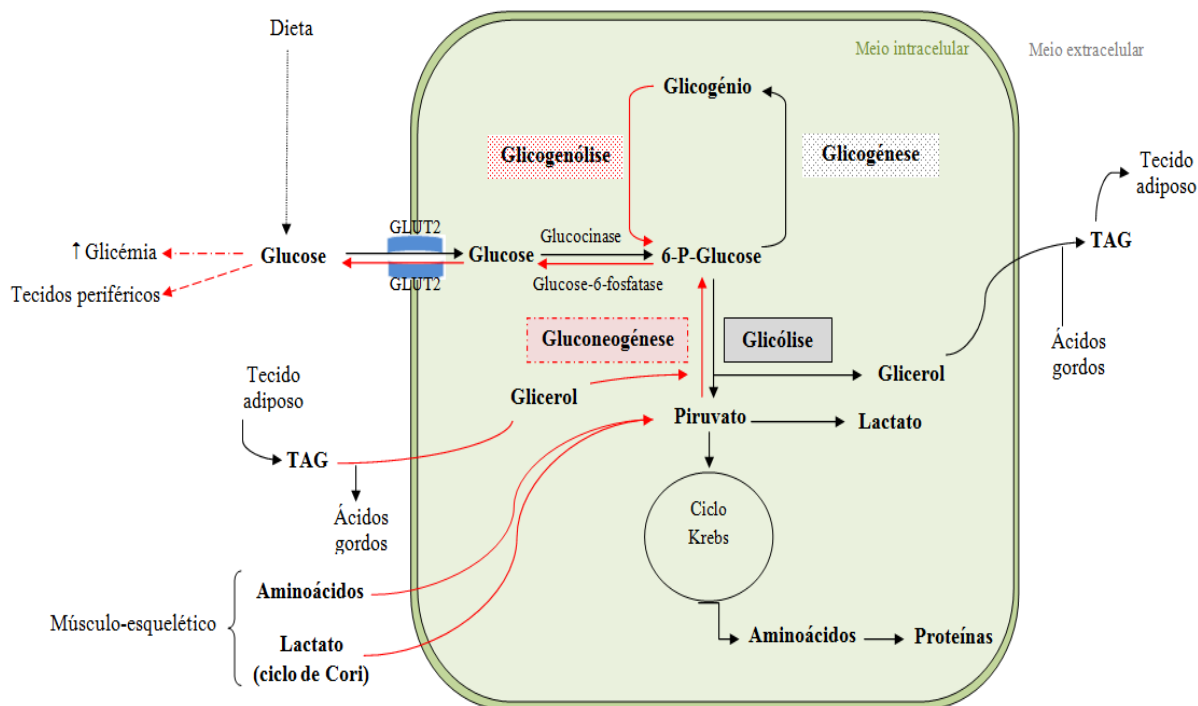
---

<sup>1</sup> Apesar da maior parte dos órgãos estarem aptos a hidrolisar glicogénio, apenas o fígado e o rim contêm glucose-6-fosfatase, enzima necessária para a libertação de glucose livre para a circulação.

<sup>2</sup> A diferença de proporções entre a produção e libertação de glucose nestes dois órgãos prende-se fundamentalmente pelo facto de somente o fígado ser capaz de sintetizar glucose a partir da degradação de glicogénio (glicogenólise), ao passo que o rim apenas produz glucose a partir de precursores não glucídicos (gluconeogénese), processo este também realizado pelos hepatócitos.

<sup>3</sup> Intervalo de tempo associado ao jejum pós-absortivo.

1). Para este efeito, os aminoácidos e o lactato provenientes do músculo, podem ser transportados até ao fígado (ou rim) onde são convertidos em piruvato e posteriormente em glucose (Afonso, 2009; He et al., 2013). Ao passo que os triacilgliceróis do tecido adiposo, ao sofrerem hidrólise, promovem a libertação de glicerol o qual consequentemente poderá ser transportado até ao fígado ou rim, onde segue a via gluconeogénica (Afonso, 2009).



**Figura 1** – Metabolismo da glucose no hepatócito. Destaca-se a **vermelho** o destino metabólico da glucose no período pós-absortivo/jejum, ao passo que a **preto** encontra-se representado o seu metabolismo aquando do estado pós-prandial. Durante o estado pós-absortivo/jejum, o fígado é o principal órgão responsável pela manutenção da glicémia, devido à sua capacidade de efetuar a glicogenólise (degradação do glicogénio) e a gluconeogénese (a partir da degradação do piruvato, lactato, aminoácidos e glicerol). No estado alimentado, com o aumento da glicémia, a produção endógena deste monossacárido diminui, ocorrendo, então, a ativação da glicólise e a rápida restituição dos níveis de glicogénio (glicogénese). TAG: triacilgliceróis; P: grupo fosfato (Adaptado de Afonso (2009) e de Fernandes (2011)).

### 2.2.2. ESTADO PÓS-PRANDIAL

Após a ingestão de uma refeição, a glucose obtida através da sua digestão é absorvida pelo lúmen do intestino delgado e transferida pela circulação sanguínea até às células-alvo (Wood & Trayhurn, 2003). Como tal, nesta condição fisiológica, e

contrariamente ao período pós-absortivo e de jejum, o fluxo de glucose ocorre como resultado de uma afluência considerável deste monossacárido exógeno para a circulação (Giugliano et al., 2008).

Neste contexto, dado o aumento substancial dos níveis plasmáticos de glucose que se fazem sentir durante esta condição, ocorre a inibição da produção endógena de glucose e consequentemente um aumento substancial da sua captação a nível celular dos tecidos periféricos (principalmente ao nível do músculo-esquelético) (Kelley et al., 1988; Roden & Bernroider, 2003). Neste sentido, o aporte celular de glucose destina-se essencialmente à síntese e armazenamento de glicogénio, tanto no músculo como no fígado, e à produção energética através da via glicolítica (Kelley et al., 1988; Klover & Mooney, 2004; Maggs, MacDonald & Nauk, 2008) (figura 1). Para este efeito, a glicólise ocorre no citoplasma de todas as células, com o intuito de conduzir à formação de piruvato, que ao entrar na mitocôndria, ingressa no Ciclo de Krebs originando moléculas redutoras necessárias para a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (figura 1) (Afonso, 2009).

Simplificando, após a refeição ocorre a ativação da glicólise e a reposição dos níveis de glicogénio, para que durante o período de jejum a obtenção de glucose face às necessidades dos tecidos periféricos provenha essencialmente da glicogenólise hepática, e mais tarde da gluconeogénese (Cao et al., 2013).

### **2.3. REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLUCOSE**

Adicionalmente ao referido quanto à homeostase energética da glucose, é de acrescentar que num indivíduo saudável, todas as vias metabólicas supra-mencionadas são finamente reguladas por um sistema complexo no qual participam vários agentes, particularmente de origem hormonal e neuronal, que efetuam a sua ação de forma a coordenar essencialmente dois níveis do metabolismo (Grayson, Seeley & Sandoval, 2013; Bano, 2013):

- a. Produção e libertação de glucose endógena;
- b. Captação e utilização de glucose pelos tecidos periféricos.

Neste sentido, têm sido descritos variados fatores relevantes para a regulação dos níveis plasmáticos de glucose, destacando-se: a insulina, a glucagina, as incretinas, a leptina, a adiponectina, cortisol, a hormona de crescimento, o sistema nervoso



autônomo, e por fim, apesar de não se conhecer a sua estrutura exata, a substância hepática sensibilizadora de insulina (HISS – *Hepatic Insulin Sensitizing Substance*) (Aronoff et al., 2004; Lutt, 2003; Giugliano et al, 2008; Bano, 2013).

Historicamente, durante décadas caracterizou-se a regulação da homeostase da glucose numa prespetiva bi-hormonal em que faziam parte duas hormonas, a insulina e a glucagina.

Assim, desde então a insulina tem sido descrita como a hormona glucoregulatória de maior importância, a qual após uma refeição atenua a hiperglicémia pós-prandial através da inibição da produção hepática de glucose, da estimulação do seu aporte periférico (especialmente ao nível do músculo-esquelético e do tecido adiposo) e pela inibição da secreção de glucagina pelas células  $\alpha$  do pâncreas (Aronoff et al., 2004; Giugliano et al, 2008).

Contrariamente, quanto à glucagina tem-se descrito que esta desempenha um papel vital no período pós-absortivo e de jejum, e é caracterizada por apresentar efeitos antagónicos aos da insulina, pelo que é considerada a maior hormona contra-reguladora das ações da insulina e consequentemente a hormona hiperglicemiante de maior potência (Aronoff et al., 2004; Bano, 2013). Para este efeito, esta hormona atua quase exclusivamente no fígado de forma a aumentar a produção hepática de glucose (Giugliano et al, 2008).

Porém, dado aos avanços científicos dos últimos anos e do aumento do interesse dos cientistas por esta área, foi então possível a descoberta de outras hormonas com ações glucoregulatórias, o que proporcionou uma expansão da compreensão da forma que diferentes hormonas contribuem para a homeostase da glucose (Aronoff et al., 2004).

Como tal, na década de sessenta, as investigações realizadas por Perley, Kipnis e seus colaboradores resultaram na descoberta do papel do trato gastrointestinal, em especial das suas hormonas – incretinas –, na regulação do metabolismo de glucose. As incretinas, em especial o péptido insulínótropico dependente de glucose (GIP) e o *glucagon like peptide* – 1 (GLP-1), são fatores secretados pela mucosa intestinal como resposta à ingestão de alimento e têm como principais funções a regulação da secreção da insulina e glucagina e a regulação da passagem e absorção dos nutrientes do trato gastrointestinal para a circulação (Aronoff et al., 2004; Bano, 2013).

Outro facto assente dos últimos anos é o papel do tecido adiposo no metabolismo energético da glucose, que se caracteriza essencialmente pela libertação de duas hormonas – a leptina e a adiponectina - que têm adquirido grande importância, principalmente por estarem associadas ao aumento da sensibilidade à insulina e pelo facto da leptina desempenhar uma função modeladora na regulação do apetite (Goldstein, 2002).

Ações contrárias têm sido apontadas ao cortisol e à hormona de crescimento, que se apresentam como hormonas contra-reguladoras por promoverem a ativação da gluconeogénese, sobretudo através do aumento da expressão das enzimas gluconeogénicas e do aporte hepático de substratos gluconeogénicos (Bano, 2013).

Como último e o mais recente ponto da regulação hormonal a merecer destaque, surge uma hormona putativa (HISS), de origem hepática, que parece desempenhar um papel preponderante na homeostase da glucose aquando do estado pós-prandial. Neste sentido, ainda que não tenha sido possível desvendar a estrutura molecular da HISS, tem sido frequentemente divulgado na literatura que esta substância promove o aporte de glucose exclusivamente a nível músculo-esquelético, após a refeição, e que a sua ação representa cerca de 55% da ação da insulina durante o estado alimentado (Lautt, 2003; Guarino, Afonso, Raimundo, Raposo & Macedo, 2003).

De forma a concluir os fatores envolvidos na regulação da homeostase da glucose, falta descrever o papel da regulação neuronal.

Neste âmbito, atendendo que o sistema nervoso autónomo é o mediador principal da resposta neuronal à estimulação interna e externa do organismo e que a maioria dos tecidos responsáveis pela manutenção da glicémia são inervados pelas fibras do sistema nervoso parassimpático e do sistema nervoso simpático, é de prever que este sistema desempenhe um papel de extrema importância na regulação dos níveis plasmáticos de glucose (Teff, 2008). Para este efeito, o sinal neuronal central e periférico contribui substancialmente para a homeostase da glucose tanto de forma direta como através do controlo da secreção hormonal (Nijima, 1989).

Tendo em conta que o sistema nervoso simpático ao controlar as ações catabólicas do organismo através da libertação de noradrenalina pelos terminais das fibras nervosas e de adrenalina pela medula supra-renal, caracteriza-se por desempenhar um papel contra-regulador relativamente à ação da insulina (Teff, 2008). Assim, visto que este sistema inerva diretamente o pâncreas e o fígado e que está normalmente associado a

condições stress em que é necessário uma resposta hiperglicemiante, irá promover a nível hepático a ativação da gluconeogénese e da glicogenólise, ao passo que a nível pancreático irá simultaneamente inibir a secreção da insulina e promover a estimulação da glucagina (Shimazu, 1981; Nijima, 1989; Afonso, 2011).

Contrariamente à componente neuronal anterior, o sistema nervoso parassimpático, constituído pelo nervo vago, regula as respostas anabolizantes aos estímulos externos provenientes da componente sensorial de ingestão de alimento e a estímulos internos do próprio corpo humano (Ahrén & Holst, 2001; Teff, 2008). Deste modo, tendo em conta que o sistema nervoso parassimpático inerva praticamente todos os tecidos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos nutrientes este desempenha um papel crucial aquando do período pré-absortivo. Como tal, ao inervar o pâncreas encontra-se associado à primeira fase de secreção da insulina e na otimização da sua secreção após a refeição (Ahrén & Holst, 2001). Ao passo que no fígado promove a ativação da glicogénese, a inibição da produção hepática de glucose, para além de desempenhar um papel fundamental na ação periférica da insulina por proporcionar a libertação hepática da hormona putativa referida anteriormente (HISS) (Ahrén & Holst, 2001; Afonso, 2011).

Em suma, todo o sistema fisiológico de homeostase de glucose é extremamente complexo e requer a interligação extrema para que todos os mecanismos funcionem como um todo e com o mesmo objetivo, visto que qualquer alteração de um destes mecanismos levará a alterações metabólicas nefastas que comprometerão todo o organismo (Fernandes, 2011).

De todos os agentes glucoregulatórios acima indicados, será relevante elucidar, nas seguintes secções, de uma forma mais pormenorizada duas hormonas – a insulina e a HISS –, uma vez que ao longo desta monografia os mecanismos propostos estão direcionados para estas duas substâncias.

### **3. INSULINA**

#### **3.1. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO**

Num contexto histórico, a formulação de uma hipótese que consistia no facto de haver uma substância secretada pelo pâncreas que proporcionasse um controlo metabólico do organismo, culminou no isolamento da insulina por Banting e Best, em 1921 (Ahmed, 2002; Wilcox, 2005; Joshi, Parikh & Das, 2007).

Por conseguinte, o isolamento desta hormona constituiu um marco na história da medicina clínica para além de ter contribuído substancialmente para o progresso da endocrinologia molecular comparativa (Chan e Steiner, 2000; Cohen, 2006; Lasker, McLachlan, Wang, Ali & Jelinek, 2010).

Subsequentemente, e inerente a este evento foram desenvolvidos estudos com o objetivo de caraterizar não só a estrutura desta hormona como também a sua função. Neste âmbito, a insulina foi a primeira proteína cuja sequência de aminoácidos foi determinada e ainda a primeira hormona cuja estrutura tridimensional foi estabelecida (Chan e Steiner, 2000; Mora, Scarfone, Calvani, Greco & Mingrone, 2003; Cohen, 2006; Hale & Coward, 2013).

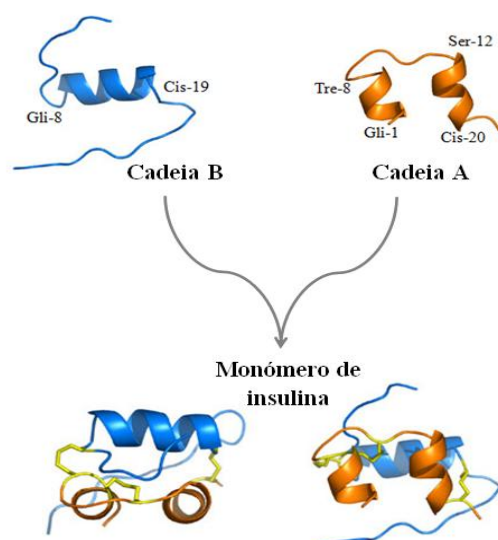
### **3.2. DEFINIÇÃO, CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURA MOLECULAR**

Posto isto, a insulina é uma hormona polipeptídica de 5.8 KDa, que apesar de circular na corrente sanguínea e se ligar ao seu recetor na forma de monómero, assume diversas formas de agregação tanto fisiologicamente como em solução (Dodson & Steiner, 1998; Silva, Ribeiro, Ferreira & Veiga, 2003; Fernandes, Denadain, Millán, Alves & Júnior, 2007). Assim, esta hormona poderá apresentar-se em forma de monómero, dímero e hexâmero, sendo que a interconversão entre cada uma destas formas dependerá de diversos fatores, nomeadamente a sua concentração, pH do meio envolvente, temperatura, força iónica e concentração de iões metálicos (Correia, Neves-Petersen, Jeppesen, Gregersen & Peterson, 2012).

Com efeito, a pH fisiológico o monómero de insulina apenas existe em baixas concentrações, designadamente a concentrações inferiores a  $1 \times 10^{-9}$  M, enquanto os dímeros desta hormona se formam a partir de concentrações de  $1 \times 10^{-9}$  M, por formação de pontes de hidrogénio entre as extremidades de duas cadeias B (Tantipolphan et al., 2010; Correia et al., 2012). Adicionalmente, é de destacar que na presença de zinco ou outro ião metálico, três dímeros de insulina rapidamente se associam de forma a originar hexâmeros (Silva et al., 2003; Tantipolphan et al., 2010). Consequentemente e inerente a este facto torna-se essencial que a concentração fisiológica da insulina atinja valores inferiores a  $1 \times 10^{-9}$  M, de forma a assegurar que esta exerça a sua ação biológica como monómero (Correia et al., 2012).

Tendo em conta que o monómero de insulina é o grande responsável pela sua ação fisiológica, torna-se fundamental proceder à descrição da sua estrutura molecular. Como tal, o monómero da insulina é constituído por duas cadeias de aminoácidos: a cadeia A, com 21 aminoácidos, e a cadeia B, com 30 aminoácidos (Santos et al., 2006; Menting et al., 2013).

A cadeia B da insulina é caracterizada por conter um segmento helicoidal central, entre os resíduos B9 e B19, enquanto a cadeia A é composta por dois segmentos helicoidais, nomeadamente entre os resíduos A1-A8 e entre os resíduos A12-A20. Em adição à cadeia B, a cadeia A é ainda caracterizada pela existência de uma ligação intramolecular através de uma ponte dissulfito entre os resíduos de cisteína A6 e A11 (Figura 2) (Dodson & Steiner, 1998; Wilcox, 2005; Meting et al., 2013).



**Figura 2** – Representação esquemática da cadeia A (a **cor de laranja**) e cadeia B (a **azul**) da insulina, e respetiva conformação em monómero. Através da figura é possível visualizar as duas pontes dissulfito (a amarelo) que interligam as duas cadeias (Adaptado de: [http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article\\_id/8/panel\\_id/2](http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/8/panel_id/2), a 1 de Setembro de 2013).

Para além disso, e de forma a produzir o monómero, estas duas cadeias de aminoácidos – A e B – encontram-se interligadas entre si por duas pontes dissulfito através dos resíduos de cisteína A7-B7 e A20-B19 (o que pressupõe a fixação das hélices da cadeia A à hélice central da cadeia B, como representado na figura 1), e ainda por uma interação entre os resíduos não implicados na formação de pontes dissulfito, de forma a originar a estrutura tridimensional da molécula. Como tal, é de concluir que a estrutura tridimensional da insulina é determinada primariamente pelas pontes dissulfito

e posteriormente por forças de Van der Waals (Silva et al., 2003; Santos et al., 2006; Correia et al., 2012).

### 3.3. BIOSÍNTESE E ARMAZENAMENTO

Tal como a estrutura da insulina, a sua biossíntese foi alvo de diversos estudos desde o momento da sua descoberta, o que consequentemente levou à descrição de vários aspetos subjacentes a este processo, tanto a nível estrutural, como a nível celular e fisiológico (Dodson & Steiner, 1998).

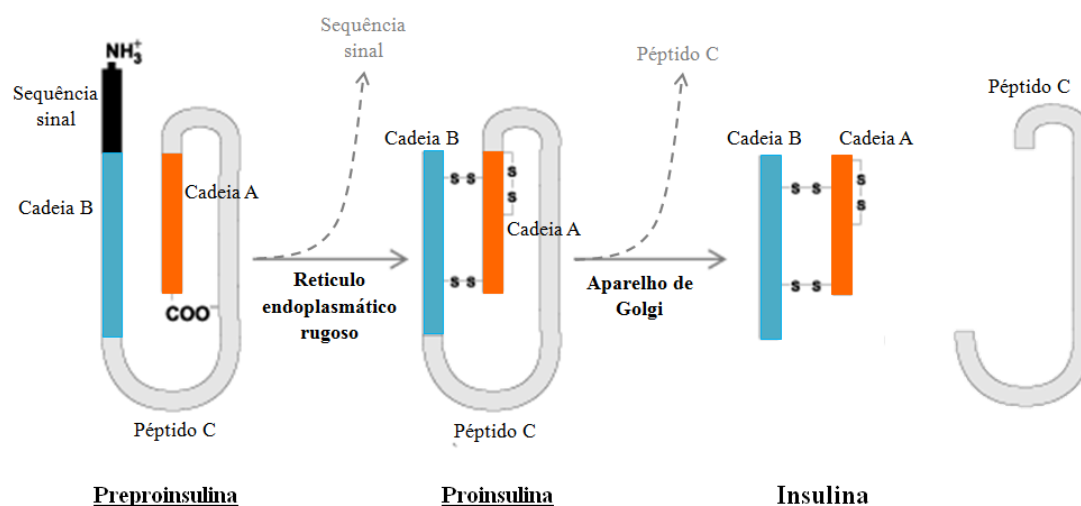
Deste modo, a insulina é sintetizada ao nível dos ilhéus de Langerhans pelas células  $\beta$  do pâncreas a partir de dois precursores: a preproinsulina e a proinsulina (Dunn, 2005; Joshi et al., 2007).

Para este efeito, numa primeira etapa e no decorrer da transcrição do gene de insulina, localizado no braço pequeno do cromossoma 11, ocorre a formação de um RNA mensageiro (RNAm) constituído por uma sequência sinal, seguido das sequências correspondentes à cadeia B, ao péptido C e por fim à cadeia A (Joshi et al., 2007; Skelin, Rupnik & Cencic, 2010).

A sequência sinal é responsável pela ligação do RNAm ao ribossoma e pela estabilização do mesmo na membrana do retículo endoplasmático rugoso (Dodson & Steiner, 1998). Assim, aquando da ligação do RNAm ao ribossoma ocorre a tradução da preproinsulina para o interior do retículo endoplasmático rugoso. Este primeiro péptido originado é então constituído por 110 aminoácidos, os quais correspondem à sequência sinalizadora, cadeia B, péptido C e Cadeia A (figura 3) (Wilcox, 2005).

De seguida, a sequência sinalizadora da preproinsulina é clivada por enzimas proteolíticas existentes no retículo endoplasmático rugoso, e por sua vez dá origem à proinsulina (figura 3) (Dunn, 2005).

Posteriormente, esta nova molécula é transportada para o aparelho de Golgi, onde é armazenada em vesículas secretórias ricas em iões de  $\text{Zn}^{2+}$  e de  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste novo ambiente, ocorre a formação de hexâmeros de proinsulina -  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6$ , dado estarem reunidas as condições essenciais para a formação dos mesmos (Dunn, 2005; Wilcox, 2005).



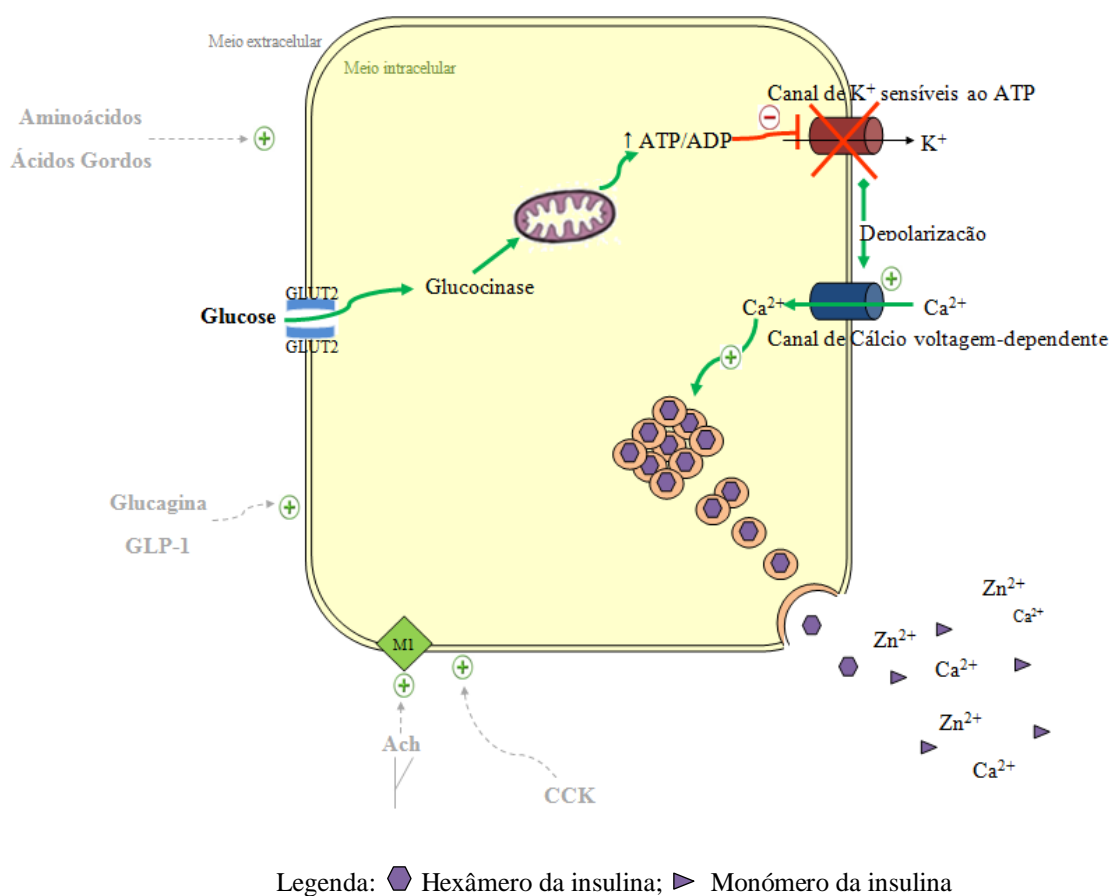
**Figura 3** - Representação esquemática de alguns dos eventos moleculares que ocorrem durante a biossíntese da insulina. Sendo de destacar que não se encontra representada a formação dos hexâmeros de proinsulina e de insulina (Adaptado de: <http://carbsanity.blogspot.pt/2013/03/measuring-insulin-levels.html>, a 1 de setembro de 2013)

Numa última etapa, com a clivagem do péptido C por parte de determinadas enzimas proteolíticas existentes nas vesículas secretórias, ocorre a conversão e maturação dos hexâmeros de proinsulina -  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6$  – em hexâmeros de insulina -  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Ins})_6$  (Dunn, 2005; Skelin et al., 2010). Por fim, nesta fase, é ainda de destacar um outro fenómeno relevante: a diminuição da solubilidade do hexâmero, que ocorre devido à remoção do péptido C do hexâmero de proinsulina; deste modo após este processo é promovida a cristalização do hexâmero de insulina dentro das vesículas secretórias. (Dodson & Steiner, 1998; Wilcox, 2005).

### 3.4. SECREÇÃO

Posterior à biossíntese e armazenamento da insulina surge a sua secreção para a veia porta, que envolve a translocação dos grânulos secretores para a membrana celular das células  $\beta$ , seguida da sua libertação por exocitose (Dunn, 2005). Para este efeito, a secreção da insulina engloba um conjunto de respostas estimulatórias, tanto ao nível extracelular como intracelular, e é caracterizada por ocorrer de forma pulsátil e sob um padrão bifásico, em que se descreve uma primeira fase aguda (i.e. de curta duração (10 minutos)) seguida de uma fase menos intensa mas de libertação sustentada da insulina, que ocorre enquanto decorrer o estímulo para a sua secreção (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Rorsman, 2005)

Deste modo, a insulina é secretada pelas células  $\beta$  do pâncreas como resposta à estimulação de diversos fatores, tais como: elevados níveis extracelulares de glucose (acima de 90 mg/dl), glucagina, *glucagon like peptide-1* (GLP-1), colecistocinina, acetilcolina, aminoácidos, ácidos gordos ou ainda alguns agentes farmacológicos (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Rhodes & White, 2002; Joshi et al., 2007). No entanto, dada a importância do estímulo da glucose para a secreção da insulina, apenas será dado ênfase ao mecanismo desencadeado por esta.



**Figura 4** – Esquematização do processo de secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, em que se encontra destacado o mecanismo intracelular de libertação desta hormona mediado pela glucose: 1) Formação de ATP pela glicólise e pelo ciclo de Krebs; 2) Elevação do rácio ATP/ADP no meio intracelular; 3) Bloqueio dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP; 4) Elevação intracelular de  $K^+$ ; 5) Depolarização da membrana celular; 6) abertura do canal de cálcio voltagem-dependente; 7) Elevação da concentração de intracelular de cálcio; 8) Exocitose dos grânulos de insulina. GLP-1: *Glucagon like peptide*; CCK: Colecistocinina; ACh: Acetilcolina.

Posto isto, na presença de níveis extracelulares de glucose acima dos 90 mg/dl, promove-se o influxo de glucose através do transportador GLUT2 presente nas células  $\beta$



do pâncreas (Thorens & Mueckler, 2010). Aquando no meio intracelular, a glucose é fosforilada pela enzima glucocinase, sendo rapidamente metabolizada de forma a produzir trifosfato de adenosina (ATP) (Wilcox, 2005). Este aumento de ATP aumenta a razão ATP/ADP, resultando no bloqueio dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Consequentemente, este evento traduz-se na depolarização da membrana plasmática das células  $\beta$ , o que impulsiona a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes (figura 4) (Rhodes & White, 2002).

Por fim, o influxo dos iões de cálcio leva a um incremento da concentração intracelular dos mesmos, o que por sua vez potencia a exocitose dos grânulos secretores com subsequente libertação do péptido C e dos cristais de hexâmero de insulina para a corrente sanguínea (Rorsman, 2005).

De seguida, visto que o meio extracelular apresenta um pH bastante superior (7.4) ao das vesículas de armazenamento (5.5), ocorre a solubilização/desintegração dos microcristais de insulina, que coincide com dissolução dos iões de zinco e cálcio presentes no hexâmero desta hormona. Assim, com a associação da ocorrência da solubilização/desintegração dos microcristais de hexâmeros de insulina com a dissolução dos iões de zinco e cálcio no plasma, promove-se a dissociação da forma hexomérica da insulina para a monomérica, sendo esta transportada pela corrente sanguínea e a que se liga ao seu recetor presente nas células-alvo (figura 4) (Dodson & Steiner, 1998; Dunn, 2005).

### 3.5. INTERAÇÃO DA INSULINA COM O SEU RECETOR

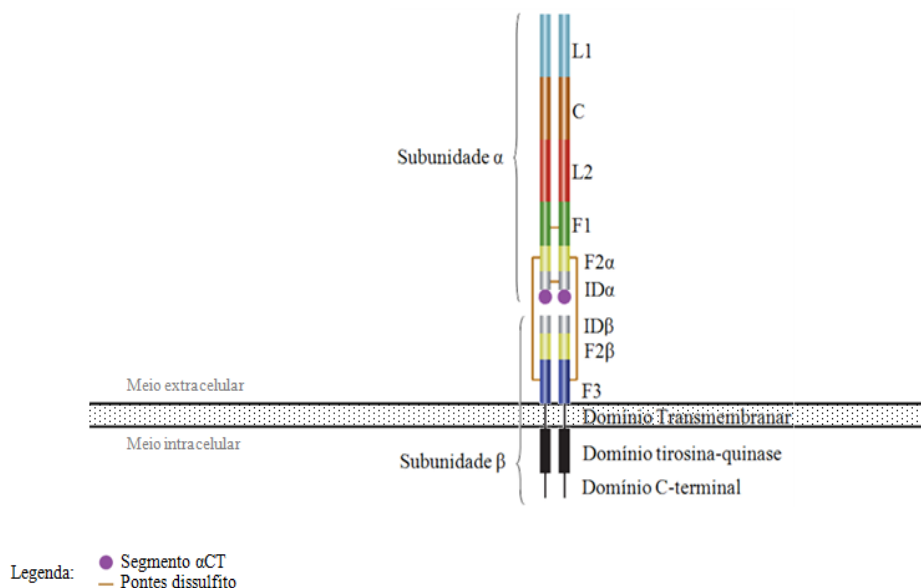
A ligação da insulina com seu recetor, presente na superfície celular dos tecidos-alvo<sup>4</sup>, desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na translocação do transportador de glucose GLUT4 do *pool* intracelular para a membrana plasmática, e no controlo do metabolismo celular (Chen et al., 2010; Menting et al., 2013).

O recetor da insulina foi caracterizado pela primeira vez em 1971, e estruturalmente encontra-se descrito como sendo uma proteína heterotetramérica, pertencente à família dos recetores de tirosina-quinase, constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas entre si por pontes dissulfito ( $\alpha_2\beta_2$ ) (figura 5) (Saltiel & Kahn, 2001; Menting et al., 2013). A subunidade  $\alpha$  é inteiramente

---

<sup>4</sup> No organismo, o conteúdo celular do recetor da insulina é variável, contudo, este apresenta uma expressão mais elevada nas que são células insulino-dependentes para a realização do controlo metabólico proteico, lipídico e glucídico. Neste âmbito, destacam-se três principais tecidos-alvo da ação da insulina: o fígado, o músculo e o tecido adiposo (Belfiore, Frasca, Pandini, Sciacca & Vigneri, 2009).

extracelular e fortemente glicosilada, enquanto a subunidade  $\beta$  apresenta um domínio extracelular ligado à subunidade  $\alpha$ , uma região transmembranar e uma região citoplasmática que contém o domínio tirosina quinase (Belfiore et al., 2009). Neste âmbito, as porções extracelulares de cada metade de recetor ( $\alpha\beta$ ) contêm seis domínios - L1, C, L2, F1, F2, F3 – e um domínio de inserção (ID) dentro do domínio F2, em que a componente da subunidade  $\alpha$  deste domínio de inserção termina num segmento denominado  $\alpha$ CT (região C-terminal da cadeia  $\alpha$ ) (figura 5) (Menting et al., 2013).



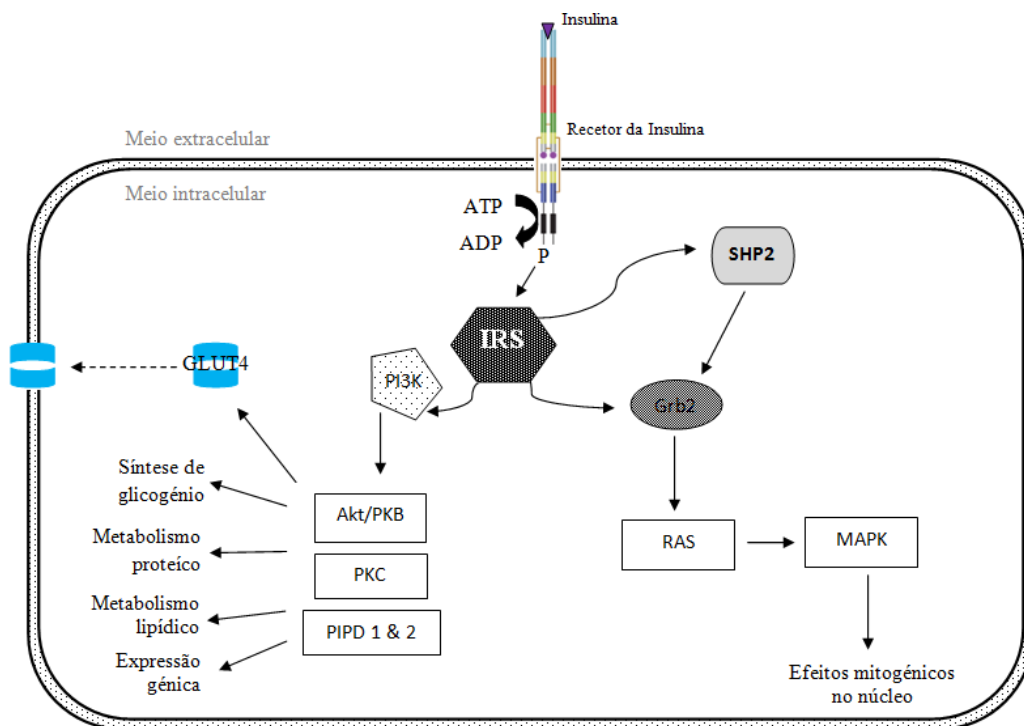
**Figura 5** – Representação do recetor da insulina. Na figura é possível constatar os domínios extracelulares, transmembranares e intracelulares desta proteína heterotetramérica (Adaptado de Menting et al. (2013)).

A ativação do recetor dá-se por ligação da insulina a duas interfaces distintas do domínio extracelular. A primeira interface é constituída pelo domínio L1 da primeira subunidade  $\alpha$  do recetor e pelo segmento  $\alpha$ CT da segunda subunidade  $\alpha$  (interface 1), ao passo que a segunda interface de ligação compreende as regiões próximas da junção dos domínios F1 e F2 da segunda subunidade  $\alpha$  (interface 2). Assim, embora existam duas subunidades  $\alpha$  livres para interação com a insulina apenas uma molécula desta hormona se liga com alta afinidade (Belfiore et al., 2009).

Neste sentido, aquando da ligação da insulina ao seu recetor ocorre uma transição estrutural no monómero desta hormona e uma mudança conformacional ao nível do recetor (Wilcox, 2005; Ward & Lawrence, 2011). Estas alterações verificadas pela interação insulina-recetor promovem a ligação de ATP à componente intracelular da subunidade  $\beta$ , com consequente fosforilação dos resíduos de tirosina do próprio recetor

e posterior ativação do domínio da tirosina-quinase (Belfiore et al., 2009; Menting et al., 2013).

De seguida, com a ativação da tirosina-quinase ocorre a fosforilação de diversos substratos proteicos intracelulares, usualmente denominados por Substratos de Resposta à Insulina (IRS), que por sua vez se ligam e ativam especificamente os domínios “src-homology-2” (SH2) de diversas moléculas sinalizadoras, nomeadamente a 3-fosfatidilinositol (PI3K), a proteína ligada ao recetor do fator de crescimento tipo 2 (Grb-2) e a proteína tirosina fosfatase tipo 2 (SHP-2), de forma a mediarem as ações metabólicas e mitogénicas da insulina (Carvalho, Zecchin & Saad, 2002; Rhodes & White, 2002).



**Figura 6** – Resumo da cascata de sinalização da insulina. Aquando da ligação da insulina ao seu recetor ocorre a ativação dos substratos IRS, o que por sua vez desencadeia vários eventos posteriores de forma a originar as ações biológicas inerentes à ação da insulina, que irão divergir dependendo do órgão alvo em causa. IRS: substratos de resposta à insulina; Akt/PKB: proteína quinase B; PKC: Proteína quinase C; PIPD 1&2: Proteína quinase dependente do fosfoinosítídeo 1 & 2; MAPK: Proteína quinase ativada pelo mitógeno (Adaptado de Wilcox (2005), Saltiel & Kahn (2001) e Rhodes & White (2002)).

Desta forma, com a ativação da PI3K ocorre a ativação de outras moléculas sinalizadoras que promovem a regulação da translocação e expressão celular dos

transportadores de glucose (GLUT4) e a estimulação do metabolismo celular. Ao passo que através da via de sinalização RAS (mediada por Grb-2 e SHP-2) ocorre a ativação dos fatores de transcrição e a estimulação do crescimento celular (figura6) (Wilcox, 2005).

Por fim, resta acrescentar que o resultado da ação da insulina em qualquer célula depende naturalmente de qual das moléculas efetoras são expressas e recrutadas para o complexo de sinalização e conseqüentemente as vias que são ativadas (Belfiore et al., 2009).

### **3.6. AÇÃO BIOLÓGICA**

Com efeito, a insulina é responsável por uma panóplia de processos fisiológicos que incluem a manutenção da glicemia (euglicemia) através do aumento do aporte de glucose no músculo e tecido adiposo e pela inibição da produção hepática de glucose. Para além dos processos anabólicos mencionados, esta proteína estimula ainda o crescimento e diferenciação celular, lipogénese, síntese proteica e de glicogénio, e inibe o metabolismo proteico e lipídico (figura 6) (Saltiel & Kahn, 2001; Rhodes & White, 2002; Hale & Coward, 2013).

Posto isto, tendo em conta a extrema importância que esta hormona tem para o controlo metabólico do organismo, é de prever que qualquer disfunção ao nível da sua síntese e/ou ação irá desencadear uma desregulação nos processos atrás indicados, o que culminará num distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicémia, proteólise e lipólise (Rhodes & White, 2002).

Neste contexto, subjacente à disfunção da ação desta hormona, surge a resistência à insulina, cujo mecanismo fisiopatológico molecular ainda não foi completamente compreendido na atualidade, apesar de estar presente em diversas patologias, particularmente na diabetes mellitus tipo 2, na obesidade e na hipertensão (Afonso, 2009).

### **3.7. DEGRADAÇÃO**

Não obstante as temáticas já abordadas, a degradação da insulina desempenha um papel fulcral na sua atividade biológica, ao promover o controlo da resposta celular à sua estimulação através da diminuição da sua disponibilidade (Mora et al., 2003). Para além disto, este processo parece estar igualmente envolvido na mediação de alguns aspetos da sua ação (Mora et al., 2003).

Apesar do que foi supracitado, é de ter em conta que por causa da complexidade considerável deste processo, o mesmo não é completamente compreendido. Como tal, o local subcelular, os mecanismos celulares e enzimáticos, e especialmente as funções biológicas da degradação da insulina são áreas ativas e de grande interesse de investigação (Duckworth, 1988). Neste âmbito, progressos significativos têm vindo a ser desenvolvidos relativamente a esta matéria, tendo-se chegado a determinadas conclusões, como as que figuram abaixo.

Em primeiro lugar, foi possível verificar que a captação e a degradação da insulina é uma característica comum de todos os tecidos sensíveis a esta hormona e de alguns tecidos não sensíveis, sendo de destacar o papel do fígado, rim, músculo, adipócitos e outros. Além disso, este processo é caracterizado por vários passos sequenciais, incluindo a ligação da insulina ao recetor de membrana, a sua internalização e degradação por parte de determinadas enzimas (Duckworth, Bennett & Hamel, 1998; Mora et al., 2003).

De todos os tecidos sensíveis à insulina, o fígado é o principal local de depuração desta proteína, sendo que aproximadamente cinquenta por cento (50%) daquela é removida durante o processo de primeira passagem. No entanto esta percentagem é variável, dependendo de diversas condições tanto a nível fisiológico como patológico<sup>5</sup> (Duckworth et al., 1998). Adicionalmente a este facto, a remoção portal de insulina poderá não implicar a sua destruição, sendo que uma quantidade significativa de insulina intacta regressa à corrente sanguínea assim como parte desta hormona parcialmente degradada, embora o significado biológico desta última seja desconhecido (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003; Fawcett et al., 2010). Outro ponto a ter em conta no que toca à degradação da insulina neste órgão, subsiste no facto da diminuição da depuração desta hormona estar associada a uma redução ao nível da sensibilidade deste tecido alvo à ação da mesma. Desta forma, esta ocorrência sustenta a relação que existe entre a degradação e a ação biológica da insulina (Duckworth et al., 1998).

Relativamente ao segundo órgão que apresenta um papel crucial na depuração da insulina - o rim -, foi possível constatar que este é o principal local de degradação da insulina a partir da circulação sistémica, sendo o responsável pela depuração de cerca de

---

<sup>5</sup> Neste contexto, encontra-se documentado que a acumulação ectópica de ácidos gordos livres (FFA) e a obesidade abdominal promovem a diminuição da degradação da insulina devido, essencialmente, à redução da função hepática (Duckworth et al., 1998; Fawcett, Sang, Permana, Levy & Duckworth, 2010).

cinquenta por cento (50%) da insulina periférica. Em geral, a degradação da insulina pelas células do rim é similar ao processo ocorrido nos hepatócitos, nos quais a insulina é internalizada em endossomas e assim iniciado o processo de degradação. Contudo, contrariamente aos mecanismos de degradação de insulina por parte do fígado, os lisossomas têm papel fundamental na degradação desta proteína ao nível dos rins. Assim, parte da insulina endossomal e parte dos fragmentos da insulina, previamente degradada, são posteriormente transferidos para os lisossomas, local onde a degradação da insulina é concluída (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

Numa última instância, a insulina que não é removida pelo fígado nem pelo rim, é eliminada por outros tecidos e células, como é o caso da insulina degradada pelo músculo, tecido adiposo, fibroblastos, linfócitos e células gastrointestinais. Entre os referidos o que apresenta maior importância é o músculo-esquelético, visto que desempenha, depois do fígado e do rim, um papel importante na remoção da insulina (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

Em suma, atendendo ao facto da degradação da insulina ser um processo que desempenha um papel crucial na sua função biológica, alterações a este nível poderão resultar em várias condições fisiopatológicas, como é o caso da diabetes mellitus tipo 2 (Mora et al., 2003; Meier, Holst, Schmidt & Nauck, 2007).

### **3.7.1. PROTEÍNA DISSULFITO ISOMERASE (PDI)**

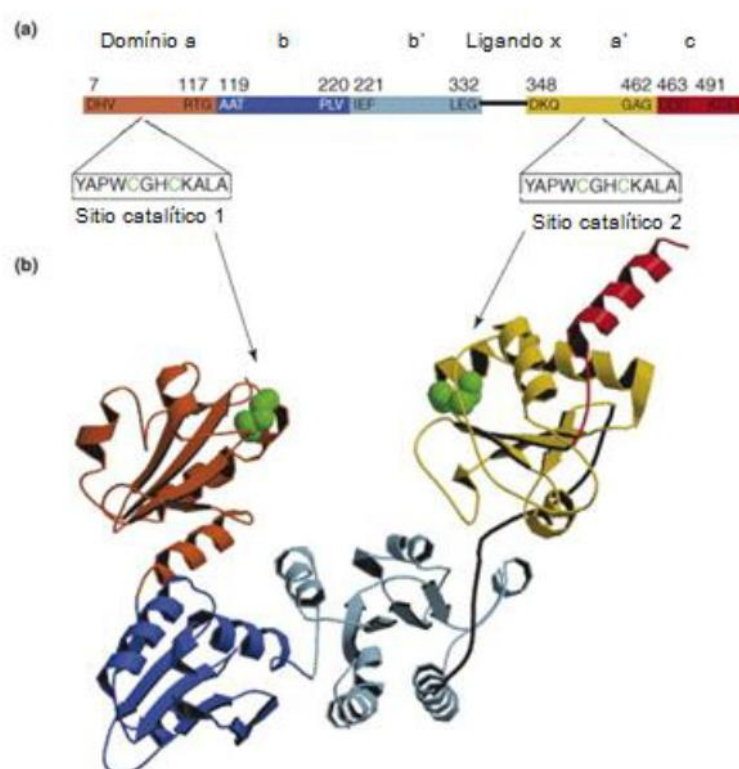
Ainda no âmbito do que foi referido anteriormente, a captação, processamento e degradação da insulina são processos sequenciais bastante complexos, sendo caracterizados pela existência de múltiplos passos e enzimas de degradação, nomeadamente: a Enzima de Degradação da Insulina (IDE), Proteína Dissulfito Isomerase (PDI) e proteases acídicas (Duckworth et al., 1998).

Porém, dada a relevância da PDI no projeto de investigação desenvolvido e dada a descoberta de que a quebra de pontes dissulfito da insulina, por parte da PDI, pode estar envolvida em alguns efeitos biológicos desta hormona, apenas será descrita esta enzima de degradação.

#### **3.7.1.1. DEFINIÇÃO DE ESTRUTURA MOLECULAR**

A proteína dissulfito isomerase foi a primeira oxiredutase, residente no retículo endoplasmático, a ser identificada. Desde então, muito tem sido estudada acerca da sua estrutura e função (Terada et al., 1995; Okada, Hashimoto & Imaoka, 2010).

Posto isto, a proteína dissulfeto isomerase é uma enzima homodimérica multifuncional, de 57 KDa, pertencente à superfamília da tioredoxina (Smith et al., 2004). Além disso, esta proteína é expressa em elevados níveis no retículo endoplasmático das células eucariotas e é caracterizada por compreender cinco domínios consecutivos, cada um com a conformação típica da tioredoxina, i.e. uma conformação originada pela seguinte sequência de hélices alfa ( $\alpha$ ) e hélices beta ( $\beta$ ):  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  (Figura 3) (Turano, Coppari, Altieri & Ferraro, 2002; Smith et al., 2004; Okada et al., 2010; Laurindo, Pescatore & Fernandes, 2012).



**Figura 7** – Representação esquemática dos cinco domínios característicos da PDI (a) e a respetiva conformação da enzima. Os resíduos de cisteína dos dois sítios catalíticos encontram-se representados a verde (Adaptado de Gruber et al., 2006).

Como é possível constatar pela figura 7 (a), os cinco domínios que constituem a proteína dissulfeto isomerase adotam a ordem a-b-b'-x-a'-c (Winter, Gleiter, Klappa & Lilie, 2011). Neste âmbito, os domínios a e a' são definidos por compreenderem dois sítios catalíticos homólogos caracterizados por conterem no seu local de ação a sequência motivo Cis-Gli-His-Cis, na qual os dois aminoácidos que se encontram entre os resíduos de cisteína têm um papel crucial na determinação do potencial redox da

enzima e, conseqüentemente, na sua função como tiodissulfeto redutase, oxidase ou isomerase (figura 7) (Wilkinson & Gilbert, 2004; Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2007; Okada et al., 2010; Rajpal, Schuiki, Liu, Volchuk & Arvan, 2012; Oka & Bulleid, 2013).

Adicionalmente, os domínios b e b' definem-se como domínios não catalíticos, em que o domínio b' representa o principal local de ligação ao substrato (Okada et al., 2010; Winter et al., 2011; Laurindo et al., 2012).

Por fim, o ligando x, como o próprio nome indica, serve de elo de ligação entre domínios b' e a', ao passo que o domínio c contém o sinal de retenção ao retículo endoplasmático, para além de conter uma região putativa que parece desempenhar um papel crucial na estabilização da conformação funcional da PDI aquando de condições extremas (Okada et al., 2010; Winter et al., 2011).

### **3.7.1.2. LOCALIZAÇÃO E ABUNDÂNCIA NO ORGANISMO**

Embora a proteína dissulfeto isomerase contenha na sua constituição uma sequência de retenção ao retículo endoplasmático, esta enzima tem sido identificada em variados locais subcelulares fora do retículo endoplasmático (Narindrasorasak, Yao & Sarkar, 2003; Jasuja et al., 2012).

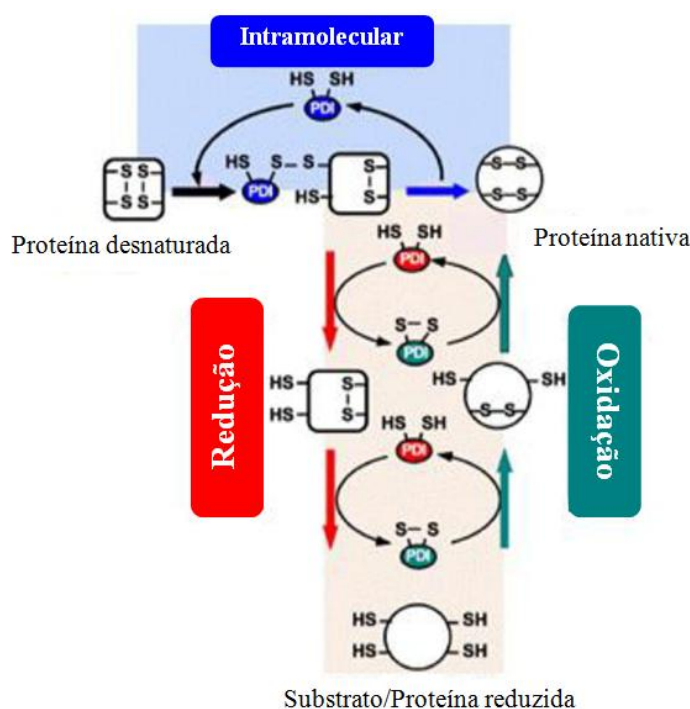
Neste âmbito, é notório que para além de ser a principal proteína residente no retículo endoplasmático, a PDI também é encontrada ao nível da membrana mitocondrial, invólucro nuclear, vesículas secretórias e na superfície de vários tipos de células, como é o caso das células endoteliais, plaquetas, linfócitos, hepatócitos, células pancreáticas e ainda dos fibroblastos, o que perfaz, aproximadamente um por cento (1%) do conteúdo total proteico a nível celular (Terada et al., 1995; Turano et al., 2002; Narindrasorasak et al., 2003; Smith et al., 2004; Raturi, Vacratsis, Seslija & Mutus, 2005; Raturi & Mutus, 2007; Pannerden, Dijk, Du & Heijnen, 2009).

### **3.7.1.3. FUNÇÕES E FATORES INTERVENIENTES**

Como referido inicialmente, a proteína dissulfeto isomerase é uma proteína multifuncional, que se encontra envolvida em diversos processos celulares (Smith et al., 2004). Assim, dependendo do potencial redox do meio envolvente, esta enzima poderá catalisar a oxidação de grupos sulfidril, ou ainda a redução e isomerização de pontes dissulfeto do substrato proteico. Este último mecanismo referido – a isomerização – poderá ocorrer diretamente por rearranjo da ligação dissulfeto intramolecular ou então,



através de ciclos de redução e oxidação, como é possível verificar pela figura 8 (Narindrasorasak et al., 2003; Smith et al., 2004; Ellgaard & Ruddock, 2005; Lappi & Ruddock, 2011).

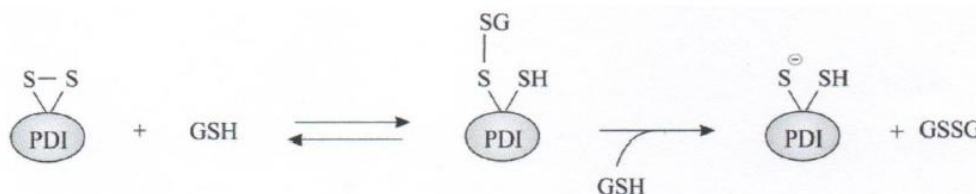


**Figura 8** – Representação dos diversos mecanismos envolvidos no processamento de substratos proteicos a partir da PDI (Adaptado de: Wilkinson & Gilbert, 2004)

Posto isto, a PDI está envolvida em diversos processos, nomeadamente: no processamento e maturação de várias proteínas (devido à sua capacidade de funcionar como chaperon no decorrer do *folding* proteico e pelo facto de estar envolvida na formação e reparação de pontes dissulfito no retículo endoplasmático) (Wilkinson & Gilbert, 2004; Alppenzeller-Herzong & Ellgaard, 2007; Rajpal et al., 2011; na agregação plaquetar (Root, Sliskovic & Mutus, 2004); em reações de transnitrosilação (sendo esta catalisada pela libertação de NO (óxido nítrico) a partir de compostos s-nitrosotióis (RSNOs)) (Root, Sliskovic & Mutus, 2004); ou ainda em processos de degradação de proteínas, sendo exemplo, a reação de redução das pontes dissulfito da insulina (Tang & Tsou, 1990; Duckworth et al., 1998; Santos et al., 2006; Maeda, Ado, Takeda & Taniguichi, 2007).

Após a descrição da função e do mecanismo de ação desempenhado por esta proteína multifuncional, é de referir que a atividade desta enzima está dependente da presença de diversos compostos, sendo de destacar os compostos potenciadores da sua

ação redutora, tendo como exemplos o GSH (glutatião na sua forma reduzida)<sup>6</sup> e o ditioneitol (DTT). Estes dois compostos ao atuarem como co-substratos da PDI oxidada, provocam a redução desta enzima, que posteriormente irá reduzir o substrato final (Tang & Tsou, 1990; Santos et al., 2006; Maeda et al., 2007; Raturi & Mutus, 2007; Oka & Bulleid, 2013).



**Figura 9** – Esquemática da cinética de redução do centro ativo (oxidado) da PDI (Adaptado de Lappi & Ruddock (2011)).

Para além dos compostos anteriormente referidos, são de realçar os que apresentam atividade inibitória em relação à PDI, sendo exemplos: os compostos s-nitrosotióis (como é o caso do S-nitrosoglutatião), a bacitracina, o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o óxido de fenilarsina (Root et al., 2004; Smith et al., 2004).

#### 3.7.1.4. RELAÇÃO ENTRE A INSULINA E A PDI – MÉTODOS DE ANÁLISE

Tendo em conta que a proteína dissulfeto isomerase é uma enzima que se encontra envolvida em diversos processos celulares, e dada a descoberta de que a quebra de pontes dissulfeto da insulina, pela PDI, pode estar envolvida em alguns efeitos biológicos desta hormona, diversos estudos têm vindo a ser realizados com o intuito de determinar tanto a atividade da PDI como os produtos de degradação originados pela catálise enzimática após a reação PDI-Insulina (Duckworth et al., 1998).

Por conseguinte, foram desenvolvidos, até à data, três métodos para determinar a atividade da PDI, sendo de referir: o ensaio de turbidimetria com recurso à insulina, o ensaio scRNase<sup>7</sup> e por fim o ensaio de fluorescência com o substrato DiE-GSSG

<sup>6</sup> Comparativamente ao retículo endoplasmático (rácio 1:1 - 3:1), os restantes constituintes celulares apresentam um rácio GSH/GSSG de aproximadamente 8:1 e é assim mantido por uma via redutora robusta que compreende a enzima glutatona redutase acoplada ao NADPH. Assim, atendendo às necessidades redutoras da PDI é de prever que fisiologicamente as reações de redução catalisadas por esta enzima sejam efetuadas no espaço extra-retículo endoplasmático, sendo um possível local a membrana plasmática celular ou a membrana mitocondrial (Raturi & Mutus, 2007; Oka & Bulleid, 2013).

<sup>7</sup> O ensaio scRNase baseia-se na função de isomerização da PDI tendo como substrato a RNase na sua forma desnaturada (Raturi & Mutus, 2007).

(glutatio diosinado)<sup>8</sup> (Root et al., 2004; Raturi & Mutus, 2007; Jasuja et al., 2012). Porém, dado que apenas o ensaio de turbidimetria monitoriza a formação de agregados moleculares dos produtos de degradação resultantes do processamento enzimático da insulina, apenas será abordado este ensaio experimental (Maeda et al., 2007).

Neste âmbito, a turbidimetria é um método de medida da redução da transmissão da luz, devido à formação de partículas ou de agregados. Sendo assim, a turbidez é determinada graças a um sistema ótico (espectrofotometria) que mede a intensidade do raio luminoso que atravessa a amostra em estudo. Consequentemente, com a formação de agregados de partículas, a intensidade será maior ou menor consoante o tamanho desse agregado e da concentração do mesmo em suspensão (Hills & Tiffany, 1980).

Posto isto, um exemplo da sua utilização é o ensaio descrito por Lundstrom e Holmgren, no qual, na presença de um ambiente redutor, ocorre a redução da insulina com recurso à ação enzimática da PDI, que através de turbidimetria (630nm) se torna possível a visualização da cinética de formação de agregados de cadeias de insulina reduzidas (Smith et al., 2004).

Com efeito, atendendo a esta característica intrínseca da PDI aquando da presença de insulina e dado a utilidade deste método de análise, poderá utilizar-se esta hormona polipeptídica para demonstrar a presença ou a atividade desta enzima numa determinada amostra biológica. Neste sentido, para a realização de tal investigação é fundamental a presença de um ensaio padrão que indique qual a cinética de reação desta enzima *per se*, de forma a que o resultado a que se chegue seja o mais fiável possível, visto que numa amostra biológica existem diversos componentes que poderão interferir na análise em causa.

Por último, relativamente aos métodos utilizados para determinação e análise dos produtos de degradação originados após catálise enzimática entre a PDI e a insulina, destacam-se três métodos de purificação, nomeadamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a eletroforese e a imunoprecipitação (Duckworth et al., 1998).

Dos mais variados métodos de análise aqui mencionados, apenas o método de turbidimetria e eletroforese foram utilizados no âmbito do projeto de investigação levado a cabo, e como tal serão descritos em detalhe no capítulo B e C desta monografia.

---

<sup>8</sup> O ensaio DiE-GSSG, é um ensaio fluorométrico que se baseia no aumento da fluorescência aquando da redução do substrato DiE-GSSG por parte da PDI (Raturi & Mutus, 2007).

#### 4. SUBSTÂNCIA HEPÁTICA SENSIBILIZADORA DA INSULINA (HISS)

Com o reconhecimento do facto de que o pâncreas é essencial para a secreção da insulina, o fígado tem um papel fundamental na sua ação periférica (extra-hepática) e de que o estado nutricional tem um papel preponderante a ação desta hormona, surgiu nas últimas décadas uma nova teoria complementar na regulação neurohormonal da homeostase da glucose – teoria da HISS, que se baseia num mecanismo fisiológico pós-prandial caracterizado pela consideração de que o fígado é o órgão regulador e o músculo-esquelético<sup>9</sup> o efetor (Lautt, 2004; Guarino & Macedo, 2006; Ceperuto et al., 2008; Afonso, 2011).

Por conseguinte, esta hipótese sofreu um enorme progresso na década de 90, com os trabalhos desenvolvidos por Lautt e colaboradores e por Macedo e colaboradores, que permitiram chegar às ilações que figuram abaixo (Afonso, 2009).

Neste sentido, no estado alimentado, cerca de cinquenta e cinco por cento (55%) da glucose captada por ação da insulina pode ser explicada por um processo de sensibilização à insulina pela refeição (MIS), em que a resposta à ação desta hormona se encontra duplicada após um estado pós-prandial. Para este efeito, a secreção da insulina por parte do pâncreas resulta na libertação de uma hormona do fígado, que atua seletivamente no músculo-esquelético para estimular a captação de glucose (figura 10). Esta hormona putativa é usualmente designada como HISS (Substância Hepática Sensibilizadora de Insulina) (Lautt, 2003; Sadri, Legare, Takayama & Lautt, 2003; Lautt, 2004; Afonso, 2011; Ming & Lautt, 2011).

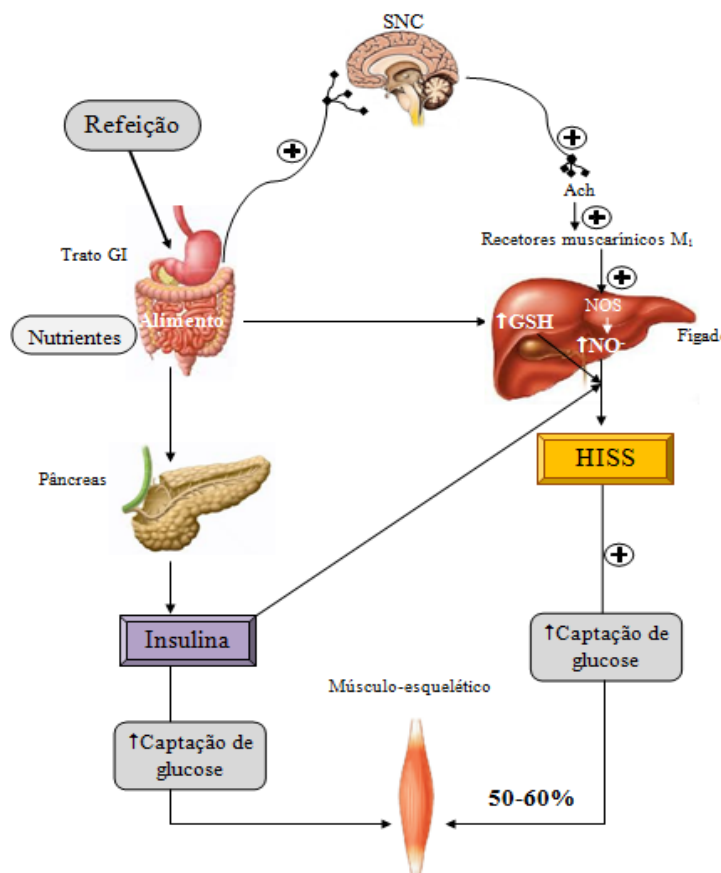
Além deste mecanismo dependente da secreção da insulina existe outro a ter em conta, dado que a própria MIS é regulada por um mecanismo permissivo do sistema nervoso autónomo (Lautt, 2004; Sadri et al., 2006). Assim, a ação da insulina, no músculo-esquelético, depende de um reflexo parassimpático hepático que conduz à libertação de acetilcolina. Esta substância por sua vez irá atuar ao nível dos recetores muscarínicos M<sub>1</sub> do fígado levando à produção de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), que na presença de concentrações ótimas de GSH hepático<sup>10</sup> promove a subsequente libertação da

---

<sup>9</sup> Como referido anteriormente, o músculo, o fígado e o tecido adiposo são os principais tecidos dependentes da insulina, mas dentro destes três é de salientar o papel do músculo-esquelético, que tem vindo a ser descrito como o principal órgão responsável pelo aporte de glucose no estado pós-prandial, representando cerca de 75% das ações da insulina. (Meyer, Dostou, Welle & Gerich, 2002; Martyn, Kaneki & Yasuhara, 2008; Fernandes, 2011)

<sup>10</sup> No estado pós-prandial encontram-se níveis bastante satisfatórios de GSH comparativamente aos verificados para períodos de jejum, os quais encontram-se bastante reduzidos (Guarino & Macedo, 2006).

substância hepática sensibilizadora de insulina (figura 10) (Correia, Guarino, Raposo & Macedo, 2002; Guarino et al., 2002; Lutt, 2003; Ming & Lutt, 2011).



**Figura 10** – Esquematização da hipótese da HISS, ilustrando a ação da insulina no músculo-esquelético pela via dependente e independente do reflexo parassimpático hepático. SNC: Sistema nervoso central; Ach: Acetilcolina; NO: Óxido nítrico; NOS: Óxido nítrico sintetase; GSH: Glutatião na sua forma reduzida; HISS: substância hepática de sensibilização à insulina (Adaptado de Lutt (2004)).

Posto isto, a ação hipoglicemiante da insulina no estado pós-prandial pode ser dividida em duas componentes que atuam de forma aditiva<sup>11</sup> para aumentar o aporte de glucose (figura 10) (Guarino et al., 2002; Laut, 2002). A primeira componente é a da insulina *per se*, isto é, correspondente à ação direta da insulina sobre a célula-alvo, ativando o seu recetor e despoletando a via de transdução de sinal atrás descrita (secção 2.5). A segunda componente de ação da insulina é dependente da via da HISS, a qual potencia a ação desta hormona (Afonso, 2009; Afonso, 2011).

Neste sentido, de forma a tornar mais explícita a importância da HISS na ação periférica da insulina e consequentemente na da homeostase da glucose, interessa

<sup>11</sup> A ação da HISS inicia-se 3-4 minutos após o início da ação da insulina, e prolonga-se durante aproximadamente 9 minutos após da ação da insulina cessar. Deste modo, este facto parece sugerir que a HISS tem um papel aditivo (i.e. atua diretamente no músculo) em vez de um papel sinérgico à ação da insulina (i.e. um papel de sensibilização do tecido-alvo à insulina) (Lutt et al., 2001; Laut, 2002).

mencionar que a libertação da insulina ocorre de forma pulsátil tanto no estado alimentado como em jejum, pelo que apenas 50% da sua secreção diária é controlada pela ingestão de alimentos (Lautt, 2003). Inerente a este facto, seria biologicamente inapropriado que a insulina libertada no estado de jejum produzisse o mesmo grau de aporte de glucose que é exigido no estado pós-prandial. Tal não acontece porque a HISS não é libertada, assegurando assim que a sensibilidade da insulina seja baixa numa altura em que o efeito hipoglicemiante da insulina não é benéfico (Lautt et al., 2001). Assim, nestas condições, o aporte de glucose é devido apenas à ação da insulina *per se* (Afonso, 2011).

Por conseguinte, fisiologicamente o efeito aditivo no aporte periférico de insulina protagonizado pela libertação da HISS está estritamente relacionado com o estado pós-prandial, em que os seu efeito é máximo após 90 minutos da ingestão da refeição (Sadri et al., 2006). Posteriormente este começa a decair progressivamente com o aumento da duração do período de jejum, até ao ponto em que a sua ação se torna nula e resulta num estado fisiológico de resistência à insulina dependente da HISS (Lautt et al., 2001). Deste modo, atendendo ao supracitado, este estado fisiológico de resistência confere um papel protetor, minimizando a ação da insulina na ausência de ingestão de glucose.

Em jeito de conclusão, a via da HISS parece estar inativa no estado de jejum e é ativada após a ingestão de uma refeição, de forma a aumentar seletivamente o aporte de glucose no músculo quando a absorção de glucose é elevada (i.e. período pós-prandial), e diminuir a captação de glucose por este órgão em situações de escassez, como no estado de jejum (Afonso, 2009).

## **5. DIABETES MELLITUS: UMA ANOMALIA PATOLÓGICA DA HOMEOSTASE DA GLUCOSE**

Subjacente às alterações fisiopatológicas da homeostase da glucose, surge uma patologia bastante em voga na atualidade: a diabetes mellitus.

### **5.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA PATOLOGIA**

A diabetes mellitus é um distúrbio crónico do metabolismo da glucose, que é caracterizado por hiperglicemia crónica assim como por perturbações do metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, que resulta de defeitos na secreção da insulina, na sua ação, ou de ambas (WHO, 2003; Forouhi e Wareham, 2010; ADA, 2013a). Assim, dada a principal característica desta patologia – hiperglicemia – é de

notar a presença de variados sintomas aquando da sua implementação, sendo de destacar os mais relevantes: poliúria, polidipsia, polifagia e visão turva (Observatório Nacional de Diabetes, 2013).

A diabetes mellitus pode ser classificada com base em quatro tipos etiológicos, designadamente, a diabetes mellitus tipo 1, a diabetes mellitus tipo 2, a diabetes gestacional e outro tipo específico de diabetes que é causada por defeitos subjacentes específicos e identificados, nomeadamente defeitos genéticos da função das células  $\beta$  do pâncreas ou da ação da insulina, para além de patologias do pâncreas exócrino, disfunções associadas a outras endocrinopatias e por fim a distúrbios da função pancreática causada por fármacos, químicos ou infeções (WHO, 2003; ADA, 2013b). No entanto, dada a relevância do tipo 2 para esta monografia e dado que as diabetes tipo 1 e o tipo 2 são consideradas os dois tipos maioritários desta doença, apenas será dado ênfase à descrição destas duas formas (Forouhi e Wareham, 2010).

Como tal, a diabetes mellitus tipo 1 surge por um processo autoimune que resulta na destruição das células  $\beta$  do pâncreas e consequentemente na deficiência absoluta da secreção de insulina (Zimmet, et al., 2001; Ashcroft e Rorsman, 2012). Assim, os doentes portadores desta forma de diabetes (geralmente crianças e adolescentes) requerem insulina exógena para sobreviver e representam cerca de 5 a 10% dos doentes diabéticos (Ashcroft e Rorsman, 2012; Observatório Nacional de Diabetes, 2013). Existe, neste forma de diabetes, uma predisposição genética apesar de outros fatores também estarem envolvidos, visto que a incidência desta patologia em gémeos homozigóticos é de apenas 50% (Lawrence, 2005).

Já a diabetes mellitus tipo 2, representante de cerca de 90% dos casos totais de diabetes e classicamente diagnosticada em adultos, é caracterizada pela ocorrência de resistência à insulina<sup>12</sup> acompanhada com deficiência relativa ou até mesmo absoluta de secreção da mesma (Zimmet et al., 2001; WHO, 2003; Tfayli e Arslanian, 2009). Deste modo, é expectável que estes doentes não dependam de insulinoaterapia para sobreviverem a não ser que os níveis de glicémia não sejam controlados apenas com terapêutica não farmacológica, ou com a associação desta com antidiabéticos orais (Zimmet et al., 2001; ADA, 2013a). À semelhança da diabetes mellitus tipo 1, existe uma predisposição genética, mas o risco de desenvolvimento da doença é fortemente influenciado por fatores ambientais, tais como a inatividade física, ingestão de

---

<sup>12</sup> A resistência à insulina é uma condição patológica em que a insulina (em concentrações fisiológicas) se torna incapaz de desempenhar os seus efeitos biológicos (Fonseca, 2007)

alimentos hipercalóricos com elevado teor de gorduras saturadas, obesidade e a idade (Lawrence, 2005; Forouhi e Wareham, 2010; Ashcroft e Rorsman, 2012) .

Além do referido relativamente a esta forma de diabetes, esta é ainda caracterizada por ser uma doença que fica por diagnosticar durante anos, visto que a hiperglicémica que a descreve desenvolve-se gradualmente e pelo estado precoce desta doença não ser suficientemente grave para que o seu portador consiga detetar os sintomas clássicos da patologia, apesar de certas anomalias metabólicas já terem ocorrido e estarem estabelecidas em várias células-alvo envolvidas na homeostase energética do organismo (ADA, 2013a).

## **5.2. COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA DIABETES**

Ainda alusivamente à hiperglicemia crónica que é característica a todas as formas de diabetes, é de salientar que esta normalmente encontra-se associada a consequências clínicas, resultantes de complicações a curto-prazo e a complicações de médio-longo prazo (ADA, 2013a).

Relativamente às complicações agudas resultantes da diabetes não controlada estas são representadas pela presença de cetoacidose diabética ou pela síndrome hiperglicémica hiperosmolar (ADA, 2013a).

Já as complicações de médio-longo prazo, são caracterizadas pelo desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares, nomeadamente: retinopatia com potencial perda de visão; nefropatia com progressão para insuficiência renal; nefropatia periférica com risco de desenvolvimento de ulcerações e amputações; doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, doença vascular periférica, acidente vascular cerebral e enfarte agudo do miocárdio; e por fim disfunção sexual (WHO, 2003; Forouhi e Wareham, 2010; Ashcroft e Rorsman, 2012; ADA, 2013a).

Assim, atendendo a este panorama, torna-se imperativo um controlo eficaz da doença de forma a evitar repercussões fatais a que esta está associada, visto que a diabetes atualmente constitui uma das principais causas de morte, particularmente por implicar um risco significativamente aumentado de doença cardiovascular e de insuficiência renal (Fonseca, 2009; Roglic e Unwin, 2010; Observatório Nacional de Diabetes, 2013).



### 5.3. PREVALÊNCIA MUNDIAL E NACIONAL

Como referido na secção 1 deste capítulo, a diabetes mellitus é uma das doenças crónicas mais comuns em todo o mundo, e a sua prevalência e significância continua a aumentar devido ao aumento do envelhecimento populacional, à crescente urbanização e ao desenvolvimento económico, que conduz a mudanças no estilo de vida caracterizadas pela redução da atividade física, pelo aumento da ingestão calórica e consequentemente pelo aumento do excesso de peso e obesidade (Cortez-Dias, Martins, Belo e Fiuza, 2009; Whiting, Guariguata, Meil e Shaw, 2011). Neste contexto, a diabetes afeta mais de 371 milhões de pessoas em todo o mundo, o que corresponde a 8,3% da população mundial. Adicionalmente a estes factos, é de ressaltar que em mais de 50% destas pessoas, a diabetes mellitus ainda não foi diagnosticada (Observatório Nacional de Diabetes, 2013).

De forma a agravar este panorama, estima-se que em 2030 o número de pessoas com diabetes atinja os 552 milhões, o que representa um aumento de 49% da população abrangida por esta doença (Whiting et al., 2011).

Dentro dos países Europeus, Portugal posiciona-se no patamar em que se revela uma das maiores taxas de prevalência desta patologia, representando 12,7% da população nacional com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, em que 7,2% corresponde aos indivíduos com diabetes mellitus diagnosticada e 5,5% à não diagnosticada (Whiting et al., 2011; Observatório Nacional de Diabetes, 2013). Além destes dados, o Observatório Nacional de Diabetes (2013) publicou, no seu relatório anual, a incidência desta patologia em Portugal desde 2000 até 2011, o que permitiu concluir que ocorreu um acréscimo de cerca de 80% de novos casos de diabetes mellitus a nível nacional. Por fim, este cenário devastador agrava-se quando se inclui a prevalência da pré-diabetes em Portugal, que totaliza 23.2% da população portuguesa com alterações diabetogénicas e consequentemente com riscos associados de desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares (Gardete-Correia et al., 2010; Fernandes, 2011).

Posto isto, atendendo aos factos expostos, a epidemia mundial da diabetes é mais corretamente atribuída ao aumento da prevalência da diabetes mellitus tipo 2 (WHO, 2003; Zimmet et al., 2001). Apesar, de não existirem dados estatísticos concretos, é conhecido que nas últimas duas décadas esta forma de diabetes, classicamente diagnosticada em adultos, começou a ver o seu papel reconhecido numa faixa etária mais precoce (i.e, adolescentes e crianças), especialmente pelo aumento da prevalência

do estilo de vida sedentário, da ingestão de alimentos hipercalóricos e da obesidade, até porque o aumento de prevalência de diabetes mellitus tipo 2 nestas idades mais jovens é paralela ao aumento de obesidade na infância e ao aumento da prevalência desta forma de diabetes nos adultos (Kahn, 2003; Moore, Zgibor e Dasanayake, 2003; WHO, 2003; Tfayli e Arslanian, 2009). Deste modo, estes acontecimentos desencadeiam uma mudança drástica no quadro epidemiológico da diabetes mellitus tipo 2, como seu aparecimento cada vez mais precoce (Zimmet et al., 2001; Sicree e Shaw).

Por último, de forma a demonstrar o efeito assolador desta patologia na sociedade, a diabetes mellitus tem sido considerada como das principais causas de mortalidade prematura, resultando em 4,8 milhões de mortes em 2012. Estes valores remetem, portanto, para que metade destes indivíduos compreendia uma faixa etária inferior a 60 anos de idade (Roglic e Unwin, 2009; Observatório Nacional de Diabetes, 2013).

#### **5.4. ENCARGOS ECONÓMICOS SUBJACENTES À DIABETES**

Consequentemente, a diabetes é uma doença dispendiosa de gerir, visto que indivíduos portadores desta patologia requerem 2 a 3 vezes mais recursos de saúde quando comparados com os não diabéticos (WHO, 2003).

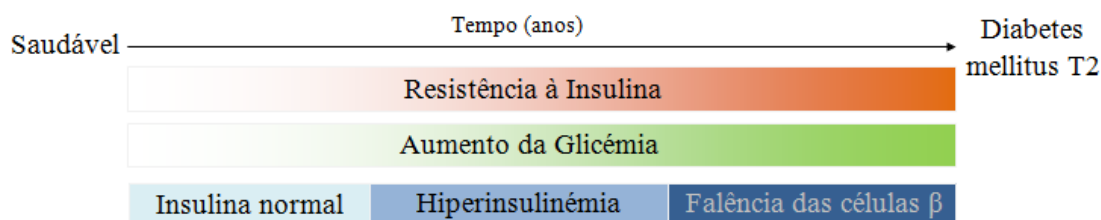
Neste âmbito, cerca de 50% do custo total da diabetes mellitus resultam de custos indiretos face ao número de anos de vida ativa perdidos quer por absentismo, aposentação precoce ou morte prematura. Dos custos diretos, tem sido demonstrado que mais de 50% são devidos a internamentos hospitalares por complicações macro e microvasculares (Moore et al., 2003; Cortez-Dias et al., 2009).

Individualizando para a despesa identificada da diabetes em Portugal no ano de 2011, estima-se que represente um custo direto entre 1 200 a 1 450 milhões de euros, o que figura 0,8% da percentagem do PIB português e 8% da percentagem da despesa em saúde desse mesmo ano (Observatório Nacional de Diabetes, 2013).

Em suma, atendendo a todas repercussões patológicas, sociais e financeiras alarmantes subjacentes à diabetes mellitus e tendo em conta que a pandemia da diabetes é mais corretamente atribuída ao aumento da prevalência da diabetes mellitus tipo 2, torna-se essencial descobrir os mecanismos intervenientes para o estabelecimento desta patologia e por conseguinte novos tratamentos que consigam combater de forma eficaz esta doença, especialmente quando se encontra no seu estado mais precoce (Lautt, 2004; Lautt, 2007; Fernandes, 2011).

## 6. ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENSIBILIDADE À INSULINA

É do conhecimento geral que a progressão da diabetes mellitus tipo 2 é iniciada com a diminuição da sensibilidade à insulina, que se caracteriza por ser uma condição patológica em que esta hormona se torna incapaz de efetuar o aporte periférico de glucose (Fonseca, 2007). Nesta fase, a homeostase da glucose é mantida graças à compensação das células  $\beta$  do pâncreas que aumentam a sua atividade, produzindo uma hiperinsulinémia compensatória (Ceriello & Motz, 2004). Posteriormente, a insulinoresistência agrava-se e as células  $\beta$  entram em declínio, pelo que já não é possível assegurar uma normal tolerância à glucose no estado pós-prandial. Contudo, apesar da atividade das células  $\beta$  estar diminuída relativamente às necessidades metabólicas, ainda é suficiente para controlar a glicémia em jejum (Ceriello & Motz, 2004; Afonso, 2009). Por fim, só numa fase tardia da progressão da doença é que ocorre a desensitização e falência das células  $\beta$ , o que promove um aumento da glicémia em jejum (Fernandes, 2011). Inerente a este evento, é nesta fase que a glicémia em qualquer dos estados prandiais atinge níveis diabéticos (hiperglicémia), permitindo assim a consolidação do estado de diabetes franca (Afonso, 2009).



**Figura 11** – Progressão da Diabetes Mellitus tipo 2.

Posto isto, a resistência à insulina<sup>13</sup> parece ocorrer muito antes das alterações da glicémia e até antes de se detetarem alterações anormais de insulinémia (Fernandes, 2011). Neste sentido, atendendo ao facto de pouco se saber quanto às primeiras alterações que ocorrem no organismo para a implementação da resistência a esta hormona, tornou-se fundamental unir esforços para a compreender quais as alterações metabólicas a que esta está sujeita, dado que este estado de insensibilidade à insulina é

<sup>13</sup> Tem sido descrito que a resistência à insulina resulta de: disfunções ao nível da estrutura e função via de sinalizadora da ação da insulina; alterações na translocação dos GLUT4; e ainda distúrbios ao nível das enzimas reguladoras do metabolismo intracelular da glucose (Shulman, 2000). Contudo, as alterações que ocorrem no organismo de forma implementarem estas disfunções encontram-se ainda pouco compreendidas e sob investigação.

visto como o ponto primordial para a progressão e fixação da diabetes mellitus tipo 2 (Tfayli & Arslanian, 2009).

Por conseguinte, nos últimos anos, devido ao aumento do interesse científico nesta área, tornou-se possível compreender que no desenvolvimento da resistência à insulina até à diabetes mellitus tipo 2 existe uma fase silenciosa em que a glicemia se mantém normal, apesar de ocorrerem graves alterações celulares no stress oxidativo e inflamação, na lipotoxicidade e na via da HISS, que não são diagnosticadas mas que fomentam modificações nefastas no organismo (Fernandes, 2011).

Neste âmbito, na presente secção procurar-se-á abordar o efeito do stress oxidativo, da lipotoxicidade, da inflamação e da diminuição da via da HISS ao nível da sensibilidade da insulina.

#### **6.1.1. LIPOTOXICIDADE E O ESTADO DE INFLAMAÇÃO CRÓNICA**

Após uma longa história de negligência por parte da comunidade científica, o tecido adiposo tem finalmente surgido como uma componente central na homeostase do organismo, apesar de acarretar uma pequena fração das ações da insulina no aporte de glucose (Rocha & Libby, 2008). Com efeito, o drástico aumento na prevalência de obesidade em todo o mundo encorajou o estudo do tecido adiposo e da sua parte integrante ao nível da resistência à insulina (Rocha & Libby, 2008).

Neste sentido, contribuíram os estudos realizados por Abel et al. (2001) em ratos *knock-out* dos GLUT4 do tecido adiposo que evidenciaram a ocorrência de resistência à insulina no músculo-esquelético e no fígado, tendo-se tornado assim evidente que o tecido adiposo desempenha um papel crítico na homeostase metabólica do organismo quando a ação da insulina se encontra comprometida neste tecido<sup>14</sup>.

Adicionalmente, encontra-se descrito na literatura que o tecido adiposo regula o metabolismo energético através da síntese e secreção de diversas substâncias, entre as quais: ácidos gordos e glicerol; algumas hormonas, como a leptina e adiponectina; e citocinas inflamatórias (*e.g.* Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 e 6 (IL-1 e 6), a proteína quimioattractante de monócito – 1 e outras), que se encontram alteradas no desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina (Goldstein, 2002; Stumvoll,

---

<sup>14</sup> Neste contexto é de salientar que a acumulação de massa gorda durante o desenvolvimento de obesidade é caracterizada por hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, o que poderá estar relacionado com a diminuição do aporte de glucose a nível deste tecido e por conseguinte ao comprometimento da ação da insulina ao nível do tecido adiposo (Torres-Leal, Fonseca-Alaniz, Rogero & Tirapegui, 2010).

Goldstein & Haeften, 2005; Kahn, Hull & Utzschneider, 2006; Martyn et al., 2008; Nola et al., 2011).

Neste contexto, o aumento dos ácidos gordos e gliceróis livres em circulação parece envolver uma acumulação ectópica de triacilgliceróis, especialmente ao nível hepático e ao nível do músculo-esquelético, o que promove uma via de sinalização da insulina disfuncional e consequentemente o desenvolvimento de insulinoresistência ao nível destes dois órgãos (Stumvoll et al., 2005).

Outro evento relevante surge com a importância da produção da leptina e da adiponectina pelo tecido adiposo. Neste contexto, a leptina atua em recetores do sistema nervoso central inibindo o consumo de alimentos e promovendo o gasto energético através da sensibilização à ação da insulina (Goldstein, 2002). Atendendo a este facto, tem-se sugerido que a resistência à leptina ou a deficiência na sua produção desempenha um papel crucial na resistência à insulina, através do aumento do apetite e consequente desenvolvimento de obesidade (Goldstein, 2002; Martyn et al., 2008). Por sua vez, relativamente à adiponectina, está descrito que esta hormona apresenta os seus níveis plasmáticos diminuídos aquando do desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina (Goldstein, 2002; Stumvoll et al., 2005; Nola et al., 2011). Com efeito, tem-se sugerido que a adiponectina interage com recetores existentes no músculo-esquelético e no fígado, onde interrompe a interação de certas substâncias que estejam a interferir com a ação da insulina a nível destes órgãos (Goldstein, 2002). Além do mais está descrito que esta hormona aumenta a sensibilidade à insulina por diminuir a acumulação ectópica de triacilgliceróis no fígado e músculo-esquelético, por promover um aumento da oxidação intracelular dos ácidos gordos nestes tecidos (Goldstein, 2002).

Para além disso, a insulinoresistência tem vindo a ser associada a um estado de inflamação crónica de baixa intensidade, de tal modo que se começou a considerar que este estado inflamatório contribui substancialmente para o seu desenvolvimento (Martyn et al., 2008; Tilg & Moschen, 2008). Neste sentido, a relação entre a inflamação e a diminuição da sensibilidade da insulina é particularmente relevante num estado de obesidade, no qual ocorre um aumento da síntese e secreção pelo tecido adiposo de mediadores inflamatórios, que proporcionam o desenvolvimento de resistência à insulina através de um mecanismo de interferência com a via de sinalização desta hormona (Martyn et al., 2008; Stumvoll et al., 2005; Torres-Leal, 2010; Fernández-Real & Pickup, 2012). Para este efeito, o TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a IL-6 ativam duas vias intracelulares constituintes da via inflamatória clássica,

designadamente a via quinase N-terminal do c-Jun (JNK) e a via do fator nuclear-kB/inibidor do quinase do fator nuclear-kB (NFkB/IKK), que promovem a fosforilação dos resíduos de serina dos IRS, resultando no impedimento da fosforilação dos resíduos de tirosina dessas proteínas, o que bloqueia a transdução do sinal a partir do recetor da insulina (Martyn et al., 2008; Stumvoll et al., 2005).

Está também descrito que estas citocinas derivadas do tecido adiposo levam à ativação da iNOS (óxido nítrico sintase induzível) o que conduz a uma grande produção de NO<sup>-</sup>, que por sua vez, na presença de espécies reativas origina formas altamente reativas de óxido nítrico que levam à produção de modificações pós-translacionais em proteínas, sendo exemplo a S-nitrosilação dos resíduos de tirosina dos IRS. Esta modificação pós-translacional promove então uma alteração negativa ao nível da via sinalizadora da insulina e consequentemente encontra-se envolvida num dos variados mecanismos relacionados com a resistência à insulina (Marty et al., 2008; Fernández-Real & Pickup, 2012). Além deste mecanismo, encontra-se também descrito, que a indução da iNO pode também estar envolvida na estimulação de vias celulares sensíveis ao stress, como será abordado de forma breve na seção 5.1.2. (Marty et al., 2008).

Por fim, um outro aspeto interessante surge com a obesidade abdominal (i.e. adiposidade visceral), e a sua associação com alterações do sistema nervoso autónomo, nomeadamente através do aumento rácio de atividade simpática/atividade parassimpática. Neste sentido, e atendendo ao que foi referido na seção 3 deste capítulo, a diminuição do parassimpático poderá estar relacionada com a insulinoresistência pós-prandial periférica através de uma diminuição da ação da HISS, a qual depende da integridade do sistema nervoso parassimpático (Afonso, 2009).

#### **6.1.2. STRESS OXIDATIVO**

Atualmente, várias linhas de evidência têm vindo a sugerir que a diabetes está associada a um estado de stress oxidativo acentuado e como tal tem sido reconhecido que este pode estar no desenvolvimento ou no agravamento da insulinoresistência periférica (Rucish, Tirosh, Patashnik, Khamaisin & Bashan, 1999; Guarino et al., 2003).

A nível fisiológico, o metabolismo glícídico e lípidico promove, naturalmente, um aumento da produção mitocondrial de radicais livres (*e.g.* espécies reativas ao oxigénio (ROS) e ao nitrogénio (RNS)). Com efeito, para se protegerem contra os efeitos nocivos destas espécies, as células podem reduzir a formação destas e/ou optar pela remoção das mesmas com recurso a espécies antioxidantes (*ex.*: GSH) (Ceriello & Motz, 2004).

Porém, uma oxidação excessiva, usualmente presente aquando do excesso de ingestão de alimentos, da obesidade e do envelhecimento, desencadeia reações citotóxicas que são lesivas para a célula, tal acontece pela ocorrência do desequilíbrio significativo entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes do organismo, ao que se resume em stress oxidativo (Ceriello & Motz, 2004; Lopes, Oliveira & Fortunato, 2008)

Neste contexto, um aumento de ROS e de RNS, leva à ativação de vias celulares sensíveis ao stress, cujos efeitos parecem interferir com a via de sinalização da insulina através do aumento de fosforilação dos resíduos de serina de alguns componentes chave da via sinalizadora, em que é exemplo os IRS. Este mecanismo, à semelhança do que foi referido anteriormente, resulta no impedimento da fosforilação dos resíduos de tirosina dessas proteínas, o que consequentemente bloqueia a transdução do sinal a partir do recetor da insulina (Rains & Jain, 2011).

Um outro aspeto relevante do stress oxidativo e em especial do contexto da presente monografia, é a observação de que os níveis de GSH encontram-se diminuídos em vários indivíduos insulinoresistentes e com diabetes mellitus tipo 2 (Robertson, 2006; Choi, Benzie, Ma, Strain & Hannigan, 2008; Rains & Jain, 2011). Neste sentido, a manutenção de GSH parece ser um mecanismo intracelular central na defesa antioxidante, para além de ser essencial para a catálise redutora da PDI<sup>15</sup> assim como para a síntese da HISS e consequentemente, para a sensibilidade à insulina pós-prandial (Guarino et al., 2003; Lauth, 2003; Choi et al., 2008).

### **6.1.3. DIMINUIÇÃO DA VIA DA HISS**

Segundo a hipótese da HISS, este mecanismo é responsável por cerca de 50% do aporte de glucose após a refeição, sendo que qualquer disfunção na síntese deste fator poderá estar na génese da resistência à insulina, obesidade, hipertensão e ainda envelhecimento (Fernandes, 2011).

Como tal, mecanismos celulares que levem a alterações hepáticas de forma a comprometer a via da HISS estão ainda por esclarecer. Contudo, tendo em conta que esta substância é dependente do sistema parassimpático, do NO e ainda do GSH

---

<sup>15</sup> Segundo Raturi e Mutus (2007), o stress oxidativo ou a diminuição do rácio GSH/GSSG, inibe drasticamente a função redutora da PDI.

qualquer alteração num destes intervenientes será crucial para que a síntese da HISS esteja comprometida (Fernandes, 2011).

Neste sentido, com a descoberta do impacto desta hormona putativa no processo de insulinoresistência, surgiu com ela uma alteração no paradigma deste distúrbio fisiológico, o que conduziu a novos métodos de diagnóstico a serem implementados e novas abordagens terapêuticas à resistência da ação da insulina (Lautt, Wang, Sadri, Legare & Macedo, 1998; Lautt, 2007; Afonso, 2011). No que diz respeito aos novos métodos de diagnóstico, é de apontar o teste rápido de sensibilização à insulina (teste de RIST), visto que se trata de uma ferramenta bastante apropriada para a quantificação da atividade da insulina, permitindo determinar tanto a sensibilidade da insulina dependente como a independente do reflexo parassimpático hepático (Lautt et al., 1998; Lautt, 2003). Já quanto às novas abordagens terapêuticas inerentes à resistência da insulina dependente da HISS, têm sido propostos diversos compostos com propriedades farmacológicas a este nível, como é o caso dos inibidores da acetilcolinesterase, dos agonistas colinérgicos, dos doadores de NO, dos precursores de glutatão e ainda dos doadores de glutatão (Lautt, 2004; Lautt, 2007; Afonso, 2011).

#### **6.1.3.1. ESTRUTURA DA HISS**

Como é possível constatar pelo que foi referido ao longo deste capítulo, vários estudos têm vindo a ser realizados com o intuito de compreender a libertação desta hormona putativa e os fatores dos quais está dependente. No entanto, ainda não foi possível desvendar a sua estrutura molecular, visto que esta se encontra em concentrações muito baixas (entre nM e pM) no sangue misturada com múltiplas proteínas e compostos, o que torna a sua purificação a partir de uma matriz biológica um processo bastante complexo. Adicionalmente, o grau de complexidade é aumentado se se verificar que o óxido nítrico (NO) é parte integrante da HISS, o que consequentemente implica um tempo de semi-vida bastante curto.

Neste sentido, esta monografia baseia-se na suposição de que a HISS possa ser um dos produtos de degradação da insulina (cadeia A ou cadeia B) nitrosilados.

##### **6.1.3.1.1. FORMAÇÃO DE S-NITROSOTIOIS**

Sendo assim, torna-se basilar proceder ao esclarecimento da formação de nitrosilados de proteínas ou péptidos, a nível fisiológico.



Com efeito, a S-nitrosilação é uma modificação pós-translacional que ocorre pela ligação covalente do NO a um grupo tiol (S-H) presente nos resíduos de cisteína, de forma a originar um S-nitrosotiol, que adquire então a estrutura genérica: R-S-N=O, onde o R é usualmente uma proteína, péptido ou aminoácido (Hogg, 2002; Richardson & Benjamin, 2002; Anand & Stamler, 2012).

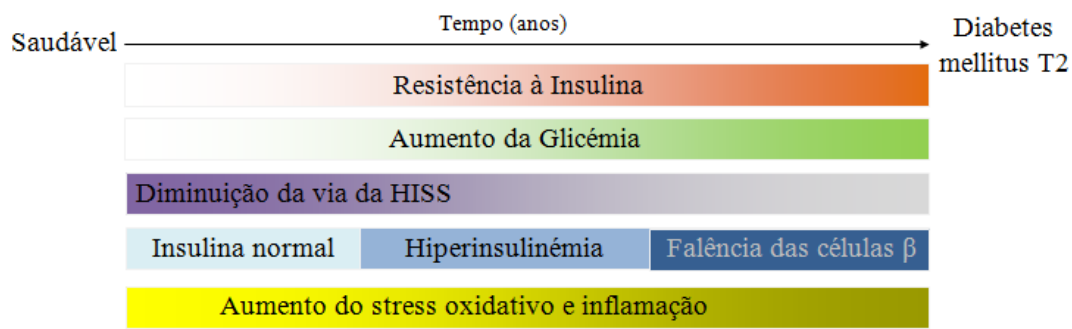
Neste contexto, as substâncias portadoras de resíduos de cisteína que compreendam um grupo tiol reativo, tornam-se então o maior alvo intracelular do óxido nítrico. Para este efeito, nos mamíferos, a S-nitrosilação celular é acoplada à síntese de óxido nítrico realizada principalmente por três isoformas de óxido nítrico sintases: NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (Anand & Stamler, 2012). Porém, a reação entre o grupo tiol e o NO não parece acontecer diretamente. Para tal é necessário que, na presença de oxigénio (O<sub>2</sub>), o NO seja oxidado a N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, o qual é caracterizado por ser um bom agente nitrosilante (Hogg, 2002; Warnecke et al., 2009). Com isto é de prever que o mecanismo de S-nitrosilação apenas é viável na presença de oxigénio, pelo que ocorre com mais facilidade em ambiente hidrófobos como é o caso da membrana celular e em especial a membrana mitocondrial, onde o oxigénio poderá existir em maiores concentrações (Hogg, 2002).

## **7. DA RESISTÊNCIA À INSULINA À DIABETES MELLITUS TIPO 2: PONTO DA SITUAÇÃO**

Após esta contextualização teórica que teve como intuito dar a conhecer melhor a progressão e o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2, propõe-se então de forma sucinta que uma das primeiras alterações a ocorrer se traduza numa incapacidade de lidar com o estado pós-prandial, nomeadamente pelo decréscimo na síntese da HISS. Esta disfunção será também acompanhada por um aumento do stress oxidativo e inflamação. Pelo que se cria, então, um ciclo onde o GSH é desviado para o combate ao stress oxidativo, perdendo a sua função na sensibilidade à insulina (i.e. na síntese da HISS) (Fernandes, 2011).

Assim, de forma a concluir, para o desenvolvimento e progressão da diabetes mellitus tipo 2, Macedo e colaboradores propõem que a diminuição da secreção da HISS será uma das primeiras disfunções a ocorrer. Esta disfunção na sua síntese deverá suceder devido a alterações de GSH e do NO hepático, que terão também implicações na capacidade antioxidante do organismo, resultando assim num aumento do stress

oxidativo e inflamação. Nesta fase não será visível qualquer alteração de glicémia e/ou secreção de insulina, pelo menos no estado de jejum. Com efeito, a disfunção pós-prandial da HISS leva a um reajuste do organismo que acabará por secretar mais insulina devido à diminuição da sua ação. Neste sentido, a hiperinsulinémia será inicialmente capaz de manter os níveis de glicémia normais e só quando o pâncreas perde a sua capacidade de síntese de insulina, ocorre falência das células  $\beta$ , e consequentemente um aumento significativo na glicémia basal (figura 12) (Fernandes, 2011).



**Figura 12** - Principais alterações no desenvolvimento da Diabetes mellitus tipo 2. (Adaptado de Fernandes (2011))

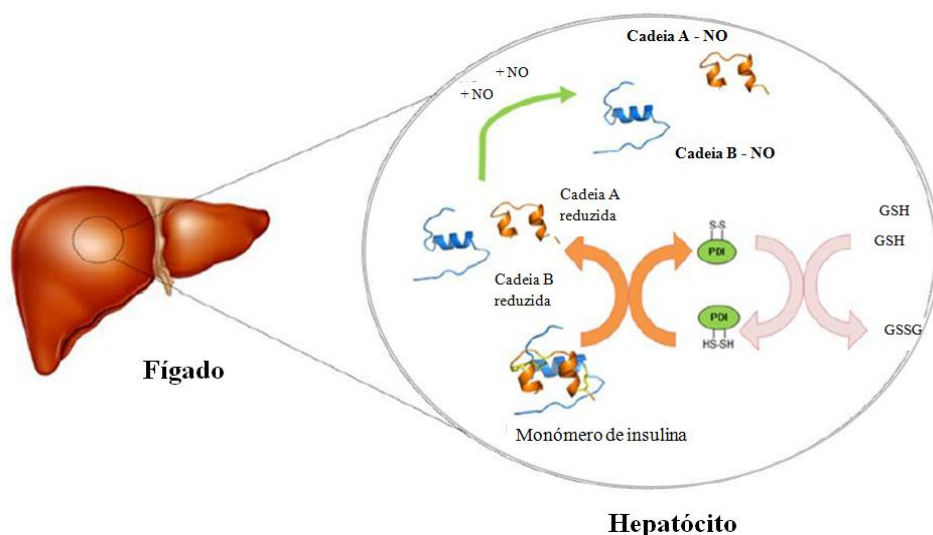
Todavia, não obstante de todos os temas abordados neste capítulo, é de extrema importância referir que muito falta descobrir sobre os mecanismos intrínsecos e extrínsecos da diabetes mellitus tipo 2. Para este efeito, com um esforço global novos mecanismos e novas terapias serão descobertos, e consequentemente impulsionarão um avanço considerável para travar esta pandemia. Neste sentido esta monografia contribui essencialmente para novas terapias que poderão ser relevantes numa fase precoce da doença.

## 8. HIPÓTESE DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO E OBJETIVOS ESTABELECIDOS

Como referido anteriormente, vários estudos têm vindo a ser realizados com o intuito de compreender a libertação da HISS e os fatores dos quais está dependente. No entanto, ainda não foi possível desvendar a sua estrutura molecular visto que esta se encontra em concentrações muito baixas (entre nM e pM) no sangue misturada com múltiplas proteínas e compostos.

### 8.1. Hipótese

Como tal, atendendo a todo o conhecimento teórico, este projeto de investigação vem propor que a HISS consiste num dos produtos de degradação da insulina (cadeia A ou cadeia B) nitrosilados, e que a enzima interveniente na formação destes produtos de degradação é a Proteína Dissulfito Isomerase presente nos hepatócitos (figura 13). Adicionalmente, sugere-se ainda a possibilidade de haver uma ligação destes novos derivados de insulina nitrosilados à albumina, de forma a promover um transporte pela corrente sanguínea até às células-alvo.



**Figura 13** - Hipótese do projeto de investigação levado a cabo.

### 8.2. Objetivos

Posto isto, com vista a tentar comprovar esta hipótese, a investigação levada a cabo foi dividida em duas abordagens. Sendo que a primeira teve o intuito de confirmar a existência de PDI nos hepatócitos, determinar a sua atividade com recurso ao ensaio de turbidimetria e analisar os produtos de degradação originados pela catálise enzimática da PDI ao nível da insulina. Ao passo que a segunda abordagem consistiu na produção de derivados de insulina (cadeia A e cadeia B) nitrosilados para posterior administração *ex vivo* e *in vivo*, e respetiva quantificação do potencial terapêutico.

## **B. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. CONJUNTURA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO**

Dada a particularidade de parceria deste projeto de investigação, as experiências levadas a cabo para o cumprimento dos objetivos estabelecidos foram realizadas em cooperação com o Departamento de Fisiologia da Faculdade de Ciências Médicas – UNL. Neste âmbito, as experiências de caráter *ex vivo* e *in vivo* foram executadas por investigadores da FCM-UNL enquanto as experiências *in vitro* foram realizadas, na Faculdade de Ciências e Tecnologias – UNL, com a devida orientação e supervisão do Prof. Doutor Francisco Jorge Caldeira.

Posto isto, para testar a hipótese estabelecida, tornou-se necessária a realização de diversas experiências laboratoriais, cujos materiais e métodos são expostos de seguida.

### **2. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA INSULINA POR VIA *IN VITRO* E RESPETIVA ANÁLISE**

Neste sentido, subjacente ao primeiro objetivo estabelecido e consequentemente à primeira vertente do trabalho laboratorial procedeu-se à realização de quatro catálises enzimáticas.

Assim, numa primeira instância a primeira e a segunda degradação enzimática consistiam em dois ensaios enzimáticos correspondentes à interação *in vitro* entre a insulina, GSH e PDI, em que estes diferiam quanto às concentrações da enzima em causa e tinham como intuito originar um ensaio de turbidimetria padrão que permitisse obter as cinéticas de reação a diferentes concentrações de modo a que se conseguisse comparar a atividade padrão da PDI com a atividade enzimática da PDI possivelmente presente nos hepatócitos de rato. Adicionalmente à primeira função deste ensaio, foram ainda utilizadas amostras da catálise enzimática ocorrida a diferentes concentrações de modo a analisar os produtos de degradação daí originados através da técnica de eletroforese.

Em segundo lugar, a terceira interação *in vitro* entre a insulina, GSH e PDI foi realizada somente com o objetivo de complementar a análise dos produtos de degradação, originados pelas duas catálises enzimáticas realizadas inicialmente, através da avaliação das diferenças dos produtos existentes no instante inicial da degradação enzimática e no instante em que já estaria completamente terminada a reação, com recurso à técnica de eletroforese.

Posteriormente, e de forma a terminar esta primeira vertente laboratorial procedeu-se à deteção da presença e atividade da PDI possivelmente existente em hepatócitos através da monitorização da interação *in vitro* entre lisados de hepatócitos, insulina e GSH com recurso à técnica de turbidimetria. Importa salientar que este último ensaio não foi submetido à purificação dos produtos de degradação originados por se tratar de uma matriz biológica muito densa.

Finalizada esta contextualização introdutória da primeira vertente do trabalho laboratorial, serão então descritos os materiais e métodos integrantes do primeiro objetivo estabelecido.

## **2.1. CATÁLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* ENTRE A PDI E A INSULINA**

### **a) Ensaio Padrão: Turbidimetria**

Como supramencionado, inicialmente foram realizados dois ensaios enzimáticos padrão, recorrendo a diferentes concentrações de PDI (2 mg/ml e 0,4 mg/ml). Com efeito, foi então necessário proceder à elaboração extemporânea de cada uma das soluções correspondentes a cada composto a ser empregue nesta experiência.

Seguidamente, e tendo em conta o carácter turbidimétrico deste ensaio, foram utilizadas duas *cuvettes* de quartzo contendo agitadores magnéticos, nas quais foram adicionadas sequencialmente: 664 µl de água milipore; 24 µl de EDTA (0,1M); 120 µl de GSH (Sigma G-4251) (0,1 M) e de tampão fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0,1 M); 120 µl de albumina bovina (Sigma A-9947) (2.24 mg/ml); 132 µl de insulina bovina (Sigma I-6634) (10 mg/ml); e por fim, 20 µl de PDI (Sigma P-3818). As duas células de quartzo apenas diferiam ao nível da concentração da PDI utilizada, sendo que a primeira apresentava uma concentração de 2 mg/ml ao passo que a segunda continha 0,4 mg/ml.

Posteriormente, colocou-se de imediato as células de quartzo no espectrofotómetro de UV-visível (da Shimadzu<sup>®</sup>) (o qual estava termostaticado a uma temperatura de 37°C), tendo-se selecionado um comprimento de onda na ordem dos 630 nm. A reação ocorreu durante meia hora, sendo retiradas amostras em intervalos regulares de 10 minutos e congeladas de imediato com recurso a azoto líquido para subsequente aplicação em eletroforese.

Finalizado o ensaio de turbidimetria, foram recolhidos os dados do espectrofotómetro para posterior análise.

### **b) Reação enzimática de longa duração (72 horas)**

Numa segunda instância, com vista à realização da terceira interação *in vitro* entre a insulina, GSH e PDI de forma a complementar a análise eletroforética dos produtos de

degradação originados pelas duas reações enzimáticas levadas a cabo na experiência 2.2.a), foi necessário recorrer a uma catálise enzimática de longa duração.

Neste sentido, procedeu-se, de forma similar à experiência 2.2.a), adicionando-se ordenadamente os seguintes compostos a um *eppendorf*: 664 µl de água milipore; 24 µl de EDTA (0,1M); 120 µl de GSH (Sigma G-4251) (0,1 M) e de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 M); 120 µl de albumina bovina (Sigma A-9947) (2.24 mg/ml); 132 µl de insulina bovina (Sigma I-6634) (10 mg/ml); e, por fim, 20 µl de PDI (Sigma P-3818), tendo-se selecionado neste caso a concentração correspondente aos 0,4 mg/ml<sup>16</sup>.

Finalizada a adição de todos os componentes da reação enzimática ao material de suporte, este foi colocado num banho de água a 37°C, fornecido pelo termostato Lauda<sup>®</sup>, durante 72 horas.

As amostras retiradas para a análise desta degradação enzimática, corresponderam ao instante de inicial (0 minutos) e ao final (72 horas), sendo que a amostra correspondente ao tempo zero foi imediatamente congelada com recurso a azoto líquido.

Naturalmente, atendendo ao propósito deste ensaio, à semelhança da experiência 2.1.a), as amostras recolhidas foram posteriormente aplicadas em eletroforese.

## **2.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* ENTRE LISADOS DE HEPATÓCITO E A INSULINA**

Para o efeito da averiguação da presença/atividade da PDI possivelmente existente em hepatócitos, procedeu-se à realização da interação *in vitro* de lisados de hepatócitos de rato com insulina e GSH. Neste sentido, foi necessário dividir esta experiência em três etapas principais, sendo que numa fase inicial foi realizada a digestão de fígado de rato com collagenase, de seguida procedeu-se à seleção e lise dos hepatócitos e posteriormente efetuou-se a determinação da presença/atividade da PDI proveniente do mesmo.

### **2.2.1. Digestão enzimática do fígado de rato Wistar (*in vivo*)**

Posto isto, atendendo que o primeiro ponto desta experiência retrata uma digestão enzimática através da técnica *in vivo*, torna-se essencial salientar, em seguimento ao que foi referido na secção 1 deste capítulo, que esta experiência foi levada a cabo pela

---

<sup>16</sup> Razão para tal facto, deve-se à atividade demasiado intensa da PDI detetada no ensaio 2.2.a) para a concentração de 2 mg/ml. Por conseguinte, procedeu-se à seleção da concentração de 0,4 mg/ml por mimetizar de forma mais aproximada o que acontece num sistema *in vivo*.

investigadora Dr.<sup>a</sup> Fátima Martins do Departamento de Fisiologia da FCM-UNL, através do método que figura de seguida.

Neste âmbito, numa fase inicial foi necessário submeter o rato Wistar a um ato cirúrgico que possibilitasse a perfusão do fígado através de uma cânula via veia porta e a saída do líquido perfundido por uma cânula via veia cava inferior. Terminada a cirurgia, procedeu-se à perfusão do fígado com 400 ml tampão de Krebs-Henseleit 1X (pH 7,4) adicionado de 0,387g de EGTA (Sigma E4378), através da cânula localizada na veia porta, durante 5 minutos a um caudal de 18 ml/min (Bomba peristáltica da B.Braun<sup>®</sup>). Finalizado este período de tempo, procedeu-se a uma nova perfusão, desta vez com 100 ml de tampão de Krebs-Henseleit 1X, contendo 17 mg de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e 50 mg de colagenase (Sigma C-5138), até que a digestão fosse visível (aproximadamente 4 a 5 minutos). De seguida, o fígado foi removido do rato e acondicionado num tubo de *falcon* para posterior preparação dos extratos de hepatócitos.

### 2.2.2. Seleção e lise dos hepatócitos

Numa segunda fase deste ensaio, antes de qualquer determinação da presença/atividade da PDI, tornou-se essencial uma preparação prévia da amostra proveniente da digestão exercida, para que fosse possível a obtenção seletiva de hepatócitos e posterior lise dos mesmos.

Deste modo, o tubo de *falcon* contendo o fígado digerido foi colocado numa centrífuga de bancada (Eppendorf 5810R<sup>®</sup>) e sujeito durante 3 minutos, à temperatura de 4°C, a uma centrifugação de 500 rpm. Terminado este processo, o sedimento com os hepatócitos foi guardado e de seguida lavado por duas vezes com tampão Krebs-Henseleit 1X e centrifugado ambas as vezes a uma rotação de 500 rpm, a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, o sedimento com os hepatócitos foi ressuspenso em 4 ml de tampão de lise (50 mM de Tris-HCL (pH 8), 300 mM de NaCl e 20 mM de imidazol) contendo uma diluição 1:200 de um comprimido de cocktail de inibidores de protease e 1% de Triton X-100. De seguida, a suspensão foi sonicada (Bandelin Sonoplus<sup>®</sup>) durante 10x20 segundos (com intervalos de 30 entre cada pulso) em gelo. Numa última instância, a amostra sonicada foi centrifugada a 3200g, durante 30 minutos. O sobrenadante foi guardado a -20°C, para posterior averiguação da atividade da PDI.

Por fim, resta apenas referir que em analogia do ensaio anterior, esta fase da experiência também foi executada pela Dr.<sup>a</sup> Fátima Martins na FCM-UNL.

### 2.2.3. Ensaio de Turbidimetria

Numa fase subsequente à preparação da amostra de fígado, tornou-se então possível a realização da determinação da presença/atividade da proteína dissulfito isomerase, dos hepatócitos já lisados.

Neste sentido, a presença e função redutora da PDI, possivelmente existente nos extratos de hepatócitos de rato, foi monitorizada pela quebra de pontes dissulfito da insulina por parte desta enzima, com recurso ao seu co-substrato GSH, através da técnica de turbidimetria ( $\lambda=630$  nm). Com efeito, adicionou-se sequencialmente a uma *cuvette* de quartzo contendo um agitador magnético: 664  $\mu$ l de água milipore; 24  $\mu$ l de EDTA (0,1M); 91,9  $\mu$ l de GSH (Sigma G-4251) (0,1 M); 120  $\mu$ l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M); 132  $\mu$ l de insulina bovina (Sigma I-6634) (10 mg/ml); e, por fim, 100  $\mu$ l de lisado de hepatócito de rato. Seguidamente, colocou-se de imediato a célula de quartzo num espectrofotómetro de UV-visível (da Shimadzu®) termostaticado a 37°C e com um comprimento de onda na ordem dos 630 nm. A reação ocorreu durante 1 hora.

Por fim, à semelhança do ensaio 2.1.a), aquando da conclusão do ensaio de turbidimetria, os dados foram recolhidos do espectrofotómetro para posterior análise.

### 2.3. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ORIGINADOS PELA CATÁLISE ENZIMÁTICA

No âmbito, da determinação dos produtos de degradação resultantes do processamento enzimático da insulina realizado nas experiências 2.1.a) (“Ensaio padrão: Turbidimetria”) e 2.1.b) (“Reação enzimática de longa duração (72h)”) atrás descritas, procedeu-se à utilização de um método rápido e eficaz de separação de misturas proteicas com base o seu peso molecular – a eletroforese SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida) (10%). Neste sentido, relativamente à eletroforese efetuada no âmbito da experiência 2.1.a) foram utilizadas as amostras referentes aos minutos 0, 10, 20 e 30 de cada uma das reações, ao passo que na eletroforese realizada no contexto da experiência 2.1.b) foram analisadas as amostras correspondentes ao instante inicial (0 minutos) e ao instante final (72h) da reação para além de três amostras padrão de insulina bovina (Sigma I-6634), albumina bovina (Sigma A-9947) e PDI (Sigma P-3818). Com efeito, foram então realizados dois géis de eletroforese, um dos quais correspondente às amostras recolhidas das duas catálises enzimáticas descritas na experiência 2.1.a), e um outro respetivo à amostragem realizada na experiência 2.1.b) adicionado de três substâncias padrão.



### 2.3.1. Eletroforese

Assim, numa fase inicial, foi necessário proceder à:

- 1º. Preparação dos sistemas de suporte para os géis e à preparação do *running* gel (a 12.5% de acrilamida), por adição de: 0,6 ml de solução I (tampão do *running* gel); 1,665 ml de solução III (acrilamida/bisacrilamida 30/08); 40 µl de SDS (dodecil-sulfato de sódio) a 10%; 1,68 ml de água destilada; 38 µl de persulfato de sódio a 10%; E por fim, a adição de 2,5 µl de N,N,N',N'-tetrametilediamina (TEMED)<sup>17</sup>.

No fim da adição de todos os componentes procedeu-se à homogeneização da mistura e pipetou-se de imediato a solução originada entre as placas de vidro dos sistemas de suporte dos géis até uma altura de aproximadamente 6 cm.

De seguida, colocou-se uma camada de 1 ml de butanol na zona superior de cada um dos dois géis de forma a obter uma superfície plana e deixou-se os géis polimerizarem.

- 2º. Após a polimerização, removeu-se o butanol com papel adsorvente.
- 3º. Posteriormente, procedeu-se à preparação do stacking gel, para o qual foi necessária a adição de: 0,45 ml de solução II (tampão do stacking gel); 0,3 ml de solução III; 0,0018 ml de SDS a 10%; 0,94 ml de água destilada; 13,5 µl de PSA; E finalmente, 2 µl de TEMED<sup>18</sup>.

Finalizada a adição, foi levada a cabo a mistura dos constituintes, com posterior enchimento das placas de vidro e colocação dos pentes para a formação dos poços de aplicação das amostras, deixando-se polimerizar.

- 4º. Numa segunda etapa, montou-se o sistema de eletroforese (fornecido pela Biorad<sup>®</sup>) e preencheu-se os tanques com tampão de corrida (Tris-glicina a 1%).
- 5º. De seguida, preparou-se as amostras para aplicação nos géis, juntando-se 15 µl de amostra + 15µl de corante das amostras (sem β-mercaptoetanol), e deixou-se ferver durante três minutos, com recurso à placa de aquecimento Rotamix da Tehtnica<sup>®</sup>.

Neste ponto é necessário ter em conta que as amostras da experiência 2.1.a) e 2.1.b) foram tratadas de forma diferente, sendo que as amostras da primeira experiência sofreram inicialmente uma diluição 50:50 em água. Ao passo que as amostras da experiência 2.1.b) foram sujeitas a duas diferentes diluições, uma em que se adicionou 10µl de amostra a 90µl de água e outra em que se adicionou 50µl de amostra a 50µl de

<sup>17</sup> As quantidades listadas para a realização do *running* gel são correspondentes à realização de apenas um gel.

<sup>18</sup> As quantidades listadas para a realização do *stacking* gel são correspondentes à realização de apenas um gel.

água. Por conseguinte, só após a diluição das amostras é que se procedeu à preparação destas para aplicação nos géis.

6º. Terminada a preparação das amostras, procedeu-se à aplicação das mesmas como indicado nas seguintes tabelas:

**Tabela 3** – Tabela representativa da ordem de colocação das amostras da experiência 2.1.a) nos poços do gel.

Amostras		Poços do gel das amostras
<b>Catálise enzimática em que a [PDI] = 2 mg/ml</b>	T=0 min.	2
	T=10 min.	3
	T=20 min.	4
	T=30 min.	5
<b>Catálise enzimática em que a [PDI] = 0,4 mg/ml</b>	T=0 min.	6
	T=10 min.	7
	T=20 min.	8
	T=30 min.	9

**Tabela 4** - Tabela representativa da ordem de colocação das amostras da experiência 2.1.b) nos poços do gel.

Amostras		Poços do gel das amostras
<b>T=0 min</b>	<b>Diluição 10:90</b>	2
	<b>Diluição 50:50</b>	3
<b>Albumina bovina</b>		4
<b>Insulina bovina</b>		5
<b>PDI</b>		6
<b>T=72h</b>	<b>Diluição 10:90</b>	7
	<b>Diluição 50:50</b>	8

Para além de se ter aplicado estas amostras nos poços já referidos, foram ainda aplicados dois marcadores de pesos moleculares. Sendo que o marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 da Fermentas® 161-0318 foi aplicado no poço nº1 do gel referente à primeira experiência (2.1.a)), enquanto o marcador PAGERULER™ Prestained #SM0671/2 da Fermentas® foi aplicado ao poço nº1 do gel referentes à “Reação enzimática de longa duração (72h)” (2.1.b)).

7º. Seguidamente, foram iniciadas as eletroforeses por aplicação de uma voltagem constante de 150 volts, durante aproximadamente uma hora, através do voltímetro da Stratagene®.

8º. Findada a corrida, retiraram-se os géis do equipamento de eletroforese.

- 9º. De seguida, submeteram-se os géis à coloração, com recurso à solução de coloração *coomassie blue* durante 30 minutos.
- 10º. Concluído este período de tempo, retirou-se os géis da solução de coloração, os quais foram posteriormente deixados a descorar.
- 11º. Por fim, finalizado o processo de descoloração, cada gel foi “mumificado” em papel *celofan*.

### **3. PRODUÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FISIOLÓGICO NO ÂMBITO TEORIA DA HISS**

A última abordagem do projeto de investigação levado a cabo visava a produção de nitrosotióis de derivados de insulina e respetiva determinação do potencial terapêutico, através da sua administração a células *ex vivo* de músculo-esquelético de rato e, ainda, a ratos Wistar. Para este efeito, foi então necessário estruturar o ensaio em cinco partes, sendo elas: a mimetização da ação biológica da PDI através da separação química da cadeia A e B da insulina; purificação da cadeia A e B da insulina pela técnica de HPLC; a nitrosilação das cadeias de insulina isoladas; a administração dos nitrosilados de cadeia A e B da insulina a células de músculo-esquelético; e por fim, a administração dos nitrosilados de cadeia A e B da insulina a ratos Wistar.

#### **1.1. PRODUÇÃO DE NITROSILADOS DE INSULINA DE CADEIA ÚNICA**

##### **1.1.1. Mimetização da ação biológica da PDI através da separação química das cadeias de insulina**

Como tal, de modo a efetuar a primeira parte desta experiência foi necessário recorrer a uma reação química, para a qual se adicionou os seguintes compostos a um frasco de vidro, pela seguinte ordem: 200 µl de ureia (16 M); 200 µl de insulina bovina (Sigma I-6634) (10 mg/ml); 4 µl de EDTA (0,1 M); e finalmente, 2 µl de β-mercaptoetanol (14,3 M).

Importa referir que a reação foi preparada e mantida no frasco de vidro (tapado com uma rolha de plástico e revestido com papel de alumínio), durante 30 minutos, numa atmosfera de árgon de modo a evitar quaisquer oxidações que poderiam ocorrer caso a mistura reacional entrasse em contacto com o oxigénio.

##### **1.1.2. Purificação da cadeia A e B da insulina pela técnica de HPLC**

Terminada a mimetização da ação biológica da PDI através da separação química das cadeias de insulina, injetou-se de imediato 20 µl da mistura reacional no aparelho de HPLC Merck L-7100 (equipado com um detetor UV L-7400 e uma interface D-7000),

em que se selecionou um fluxo de 0,7 ml/min e um comprimento de onda de 230 nm. De forma a permitir a corrida cromatográfica e consequente separação em causa, adaptou-se ao aparelho de HPLC a coluna Superdex peptide e o tampão de eluição constituído por ácido fórmico a 20%. Com este procedimento, pretendia-se a separação das cadeias de insulina reduzidas para dois recipientes distintos, visto apresentarem tempos de retenção díspares (como será demonstrado no capítulo C).

### 1.1.3. Nitrosilação das cadeias de insulina isoladas

Concluída a recolha de cada uma das cadeias (dissolvidas em ácido fórmico 20%), procedeu-se à elaboração dos novos derivados de insulina nitrosilados de acordo com as seguintes possíveis formulações (Tabelas 5):

**Tabela 5** – Constituição de cada um dos derivados de insulina – Padrões e Produtos (com e sem NO, e com e sem albumina). A: Cadeia A; B: Cadeia B; Alb: Albumina; NO: óxido nítrico; Brc: Branco; NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio; NaNO<sub>2</sub>: Nitrito de sódio.

REAGENTES	Produto A	Produto B	Produto C	Produto D
Atmosfera de árgon	Saturado	Saturado	Saturado	Saturado
NaHCO <sub>3</sub>	0,27 g	0,27 g	0,27 g	0,27 g
Água milipore	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
GSH (0,1M)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
EDTA (0,1M)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
NaNO <sub>2</sub>	0 µl	75 µl	0 µl	75 µl
Albumina (0,75 mg/ml)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Ácido fórmico a 20%	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
Cadeia A	1,5 ml	1,5 ml	0 ml	0 ml
Cadeia B	0 ml	0 ml	1,5 ml	1,5 ml
Produto originado	A+Alb	A-NO+Alb	B+Alb	B-NO+Alb
REAGENTES	Padrão A	Padrão B	Padrão C	Padrão D
Atmosfera de árgon	Saturado	Saturado	Saturado	Saturado
NaHCO <sub>3</sub>	0,27 g	0,27 g	0,27 g	0,27 g
Água milipore	1 ml	1 ml	0 ml	0 ml
GSH (0,1M)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
EDTA (0,1M)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
NaNO <sub>2</sub>	0 µl	75 µl	0 µl	75 µl
Albumina (0,75 mg/ml)	0 ml	0 ml	1 ml	1 ml
Ácido fórmico a 20%	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Cadeia A	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
Cadeia B	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
Produto originado	Brc	Brc+NO	Alb	Alb-NO

Assim, de acordo com a tabela apresentada, os reagentes foram adicionados sequencialmente e lentamente no sentido descendente da primeira coluna, sempre na presença de agitação constante.

Por fim, com a visualização da tabela 5, é então perceptível que esta experiência visava a realização de padrões de comparação para além da produção dos novos derivados de insulina nitrosilados. A razão para tal era a obtenção de resultados que permitissem comparações viáveis entre cada um dos compostos a serem administrados *ex vivo* e *in vivo*.

## **1.2. EXPERIMENTAÇÃO *EX VIVO* E *IN VIVO* DOS NITROSILADOS DE INSULINA DE CADEIA ÚNICA**

Concluída a síntese dos nitrosotióis e respetivos padrões, estes foram enviados para a FCM-UNL com o intuito de determinar o seu potencial terapêutico, através da sua administração *ex vivo* em células de músculo-esquelético de rato Wistar, e *in vivo* a ratos Wistar. Para o efeito, a administração dos compostos em análise às células foi levada a cabo pela investigadora Dr.<sup>a</sup> Joana Gaspar do Departamento de Fisiologia da FCM-UNL, ao passo que a experimentação *in vivo* ficou ao cargo do investigador Dr. Ricardo Afonso do Departamento de Fisiologia da FCM-UNL.

### **a) Em células de músculo-esquelético de rato Wistar**

Posto isto, numa primeira instância submeteu-se à determinação do potencial terapêutico dos nitrosotióis e respetivos padrões através da avaliação da captação de 2-deoxi-glucose (marcada com trítio radioativo) pelas células de músculo-esquelético de rato Wistar.

Assim, em primeiro lugar semeou-se as células em placas multipoços (6 poços), próprias para cultura de tecidos, que continham meio de crescimento, de modo a possibilitar o crescimento, confluência e diferenciação dos mioblastos em miotubos.

Posteriormente, 3 horas antes da experiência promoveu-se a privação das células diferenciadas do soro de crescimento, com recurso ao meio essencial mínimo (modificação alfa). Finalizado este período de tempo, iniciou-se a experiência propriamente dita a 37°C.

Como tal, adicionou-se:

- Ao primeiro grupo de células 100nM de insulina ou de derivados de insulina nitrosilados/Padrão (cadeia A + albumina, cadeia A nitrosiladas + albumina,

cadeia B + albumina, cadeia B nitrosiladas + albumina, albumina e albumina nitrosilada) aos miotubos;

- Ao segundo grupo de células 75nM de insulina, de derivados de insulina nitrosilados (cadeia A + albumina, cadeia A nitrosiladas + albumina, cadeia B + albumina, cadeia B nitrosiladas + albumina e cadeia A nitrosilada + Cadeia B nitrosilada) ou derivados de insulina nitrosilados adicionados de insulina (cadeia A nitrosiladas + albumina + insulina e cadeia B nitrosiladas + albumina + insulina) aos miotubos;
- E por fim, ao terceiro grupo 50nM de insulina, de derivados de insulina nitrosilados (cadeia A + albumina, cadeia A nitrosiladas + albumina, cadeia B + albumina, cadeia B nitrosiladas + albumina e cadeia A nitrosilada + Cadeia B nitrosilada) ou derivados de insulina nitrosilados adicionados de insulina (cadeia A nitrosiladas + albumina + insulina e cadeia B nitrosiladas + albumina + insulina) aos miotubos;

Neste sentido, após a adição de cada composto, as reações foram deixadas ocorrer durante 30 minutos.

Adicionalmente, para além das células que foram adicionadas de insulina ou de derivados de insulina nitrosilados, é de destacar que se deixou de parte algumas células não tratadas para medição da captação de glucose basal (controlo) e para a medição da captação de glucose não específica (i.e. transporte de glucose independente de GLUT4).

Numa quarta etapa, as células foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com HEPES (constituída por 140 mM de cloreto de sódio (NaCl), 20 mM de Hepes-Na (pH 7.4), 5 mM de cloreto de potássio (KCl), 2.5 mM de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 1 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)) (2 ml/poço), à temperatura ambiente. Após as lavagens procedeu-se à aspiração de qualquer tampão remanescente.

Seguidamente, para determinação da captação de glucose específica, adicionou-se às células solução de transporte constituída por 10 µM de 2-deoxi-glucose e 0.5 µCi/ml de H<sup>3</sup> 2-deoxi-glucose (1 ml/poço). Ao passo, que para a determinação da captação de glucose não específica utilizou-se solução de transporte constituída por 10µM de 2-deoxi-glucose, 0.5 µCi/ml de H<sup>3</sup> 2-deoxi-glucose e 10 µM de citocalasina B.

Terminada a adição de cada solução de transporte, incubou-se cada placa de cultura de tecidos à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Aquando da finalização do tempo de incubação removeu-se de imediato a solução de transporte e lavou-se por

três vezes com uma solução STOP gelada, constituída por 0.9% de NaCl. Após cada lavagem, procedeu-se à aspiração da solução STOP até as placas de cultura ficarem completamente secas.

Posteriormente, adicionou-se 1.25 ml de hidróxido de sódio (NaOH) (0.05M) às placas de cultura de tecidos, com o objetivo de promover a lise das células. De seguida, desta suspensão foram retirados 900µl de cada poço e colocados em frascos contendo 1 ml de solução de cintilação.

Por fim, os frascos contendo as amostras finais foram submetidos à determinação da captação de glucose através de um contador de cintilação líquida.

i. Análise estatística

Cessada a determinação da captação de glucose, os dados obtidos foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão da média (EPM). O teste utilizado para a análise da significância estatística foi o teste ANOVA seguido do teste de Dunnett e o nível de significância estatístico foi considerado quando  $p < 0.05$ .

**b) Em ratos Wistar (ensaio ainda em desenvolvimento)**

Numa fase subsequente à experimentação *ex vivo* dos nitrosotióis e respetivos padrões, procedeu-se à realização de ensaio *in vivo* relativo ao potencial terapêutico destes compostos.

i. Procedimento cirúrgico

Como tal, numa fase inicial tornou-se fundamental proceder a um ato cirúrgico para que fosse possível uma correta averiguação do potencial terapêutico dos produtos em análise.

Deste modo, numa primeira instância submeteu-se os ratos Wistar (machos, com cerca de 9 semanas de vida) a um jejum de 24h. De seguida, estes foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico intraperitonealmente (65 mg/kg). Após a anestesia, os ratos foram colocados em decúbito supino sobre um bloco de aquecimento e sob uma lâmpada, de modo a que temperatura corporal dos mesmos fosse mantida a 37-38°C. Neste sentido, a temperatura corporal do animal foi monitorizada com recurso a uma sonda retal.

Posteriormente, deu-se início ao ato cirúrgico propriamente dito, tendo-se seguido o protocolo previamente descrito por Lauth et al. (1998). Assim, em primeiro lugar procedeu-se à canulação da traqueia (através do tubo de polietileno PE240), de forma a permitir a respiração espontânea dos animais.

De seguida, e de forma a proporcionar a obtenção de um circuito de amostragem arteriovenoso, efetuou-se a canulação da veia e artéria femorais (através dos tubos de polietileno PE50) com posterior ligação das mesmas a um shunt arteriovenoso de silicone (Figura 14).



**Figura 14** – Resultado final de uma das cirurgias levadas a cabo para a administração dos compostos em interesse.

#### ii. Particularidades pós-cirúrgicas

Adicionalmente é ainda de acrescentar que a anestesia foi mantida durante todo o tempo das experiências através de uma infusão contínua de pentobarbital sódico a uma taxa de 10 mg/h/kg.

Para além disso, importa referir que o circuito de amostragem foi mantido sem obstruções através de injeções de uma solução salina de heparina (200 IU/kg), e que a amostragem de glicémia foi realizada pela punção no lado arterial (esquerdo) do shunt de silicone, enquanto as infusões de pentobarbital e dos demais compostos foram realizadas através de punção no lado venoso (direito).

#### iii. Pós-cirurgia: determinação da glicémia basal

Findadas as cirurgias, os animais foram deixados estabilizar por 30 minutos e de seguida, procedeu-se à determinação basal dos níveis de glicémia através de amostragens de intervalos de cinco minutos num total de 10 minutos (0, 5 e 10 minutos), sendo que cada amostra foi imediatamente examinada com recurso a um analisador de glicémia (Yellow Springs Instruments®). Subjacente a estas amostragens, realizou-se a média dos três valores de glicémia detetados para o estabelecimento de



uma euglicemia ideal do animal, sendo este valor final o utilizado como referência durante os RIST a efetuar.

iv. Testes de RIST e administração de nitrosilados de insulina e seus padrões (Protocolo 1 e 2)

Conhecido o valor de euglicemia dos animais, foi então possível proceder à determinação do potencial terapêutico dos novos derivados de insulina nitrosilados. Para este efeito, elaboraram-se dois protocolos com objetivos distintos mas que continham uma similaridade intrínseca: várias elaborações de testes RIST.

Neste âmbito, torna-se essencial então proceder a uma explicação prévia da técnica de RIST antes de passar à apresentação dos protocolos seguidos para a determinação do potencial terapêutico dos derivados de insulina. Assim, o teste de RIST consiste na infusão de insulina (50 mU/kg) a uma taxa de 6 ml/h durante 5 minutos. Paralelamente, após 1 minuto da infusão de insulina, a primeira amostragem de glicemia é recolhida e iniciada a infusão de glucose (1g/10 ml) a uma taxa de 0.6 ml/h, de forma a evitar o rápido declínio dos níveis de glicemia. Como tal, aquando do princípio da infusão de glucose, inicia-se uma amostragem de 2 em 2 minutos para a determinação da glicemia, e dependendo do valor que esta apresentar, ajusta-se a taxa de infusão de glucose de forma a manter a euglicemia ideal. Por fim, dá-se por terminado o RIST, quando não for requerida a infusão de glucose para manter a euglicemia.

Quanto aos resultados obtidos através desta técnica, estes são expressos de acordo com o índice de RIST, que consiste no montante de glucose (mg/kg) necessário a ser infundido durante todo o processo de forma a manter a euglicemia<sup>19</sup>.

Posto isto e finalizada a explicação da técnica de RIST importa realçar os procedimentos realizados para a determinação do potencial terapêutico dos novos derivados de insulina.

Neste sentido, relativamente ao protocolo I procedeu-se do seguinte modo:

- 1º. Realizou-se um teste RIST controlo, com administração de insulina a 25 um/kg;
- 2º. Finalizado o RIST controlo, efetuou-se a determinação de uma nova glicemia basal;

---

<sup>19</sup> Neste sentido, quanto maior o índice de RIST maior será a captação de glucose pelo organismo e por conseguinte maior será a sensibilidade ao produto em análise.

- 3º. De seguida, procedeu-se à realização do RIST, com a administração de 0,875 µg/kg dos produtos sintetizados em laboratório: cadeia A; cadeia A nitrosilada; cadeia B; cadeia B nitrosilada; ou albumina.
- 4º. Terminado este RIST de determinação do potencial terapêutico, realizou-se uma nova determinação da glicémia basal.
- 5º. Por fim, de forma a terminar o propósito deste protocolo, efetuou-se um RIST, no qual se administrou 0,875 µg/kg dos produtos sintetizados em laboratório (cadeia A + albumina; cadeia A nitrosilada + albumina; cadeia B + albumina; cadeia B nitrosilada + albumina; ou albumina) concomitantemente com insulina (25 mM).

Já para o protocolo II, tornou-se necessário realizar:

- 1º. Inicialmente, um teste RIST controlo, com administração de insulina a 50 µM/kg;
- 2º. Findado o RIST controlo, procedeu-se de seguida à administração de 0,875 µg/kg dos produtos sintetizados em laboratório (cadeia A + albumina; cadeia A nitrosilada + albumina; cadeia B + albumina; cadeia B nitrosilada + albumina; ou albumina) durante 2 minutos e 30 segundos;
- 3º. Cessado esse período de tempo, foram retiradas amostras de glicémia aos 5, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos referentes ao fim da administração;
- 4º. Posteriormente, após a determinação de uma nova glicémia basal, iniciou-se um segundo RIST designado por RIST pós cadeia A + albumina, cadeia A nitrosilada + albumina, cadeia B + albumina, cadeia B nitrosilada + albumina, ou albumina I, em que se administrou insulina (50 µM);
- 5º. Por fim, e tal como no passo anterior, procedeu-se a uma nova determinação da euglicémia ideal, sendo esta etapa seguida por um novo e último teste RIST designado por RIST pós cadeia A + albumina, cadeia A nitrosilada + albumina, cadeia B + albumina, cadeia B nitrosilada + albumina, ou albumina II.

Em conclusão, e de forma a dar por terminada esta seção (e por conseguinte este capítulo) falta apenas salientar que os protocolos I e II compreendiam fins distintos, sendo que o protocolo I tinha como objetivo determinar a captação de glucose por parte dos novos produtos sintetizados em laboratório e ainda determinar se estes, em administração concomitante com a insulina, aumentavam a sensibilidade a esta hormona para um patamar de 50%. Por seu turno o protocolo II teve como intuito determinar a atividade residual (i.e. o tempo de semi-vida) dos compostos produzidos.

## C. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos descritos anteriormente permitiram a obtenção de diversos resultados, os quais serão apresentados e discutidos ao longo do presente capítulo da monografia.

Neste sentido, é importante salientar que em cada seção que o constitui será levada a cabo inicialmente a fundamentação teórica dos reagentes utilizados ao longo das experiências e numa segunda etapa serão então apresentados e discutidos os respectivos resultados.

### 1. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA INSULINA POR VIA *IN VITRO* E RESPECTIVA ANÁLISE

#### 1.1. CATÁLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* ENTRE A PDI E A INSULINA

Posto isto, os aspetos teóricos inerentes à degradação enzimática da insulina por via *in vitro*, são explicadas à luz da utilização de diversos compostos, nomeadamente o tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), o EDTA, o GSH, a albumina (exceto na catálise enzimática realizada por parte dos lisados de hepatócitos – experiência 2.2.), a insulina e por fim a PDI ou lisados de hepatócitos de rato Wistar, consoante a experiência em causa.

Deste modo, o tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de pH 7.4 foi utilizado com o intuito de mimetizar o pH fisiológico, visto este último ter uma função vital ao nível do equilíbrio ácido-base, o que permite a ocorrência de reações enzimáticas, para além da integridade de todos os constituintes celulares.

Relativamente ao uso do EDTA, poderá ser explicado pelo facto deste composto se tratar de um agente quelante envolvido na formação de complexos de elevada estabilidade com vários iões, entre os quais os metais de transição. Assim, a ocorrência da formação de complexos entre o EDTA e iões presentes em solução permite evitar a ocorrência de precipitados originados pela interação destes iões com constituintes em solução, evitando assim qualquer interferência com a reação em estudo.

No que toca ao GSH, este foi utilizado por três razões: primeiro por se tratar de um tiol de baixo peso molecular predominante nas células eucariotas; segundo por se apresentar como um co-substrato redutor da PDI que potencia a catálise enzimática realizada por esta enzima ao nível da insulina; e, por fim, por se tratar de um componente de extrema importância na teoria da HISS, na qual se encontra aumentado no estado pós-prandial.

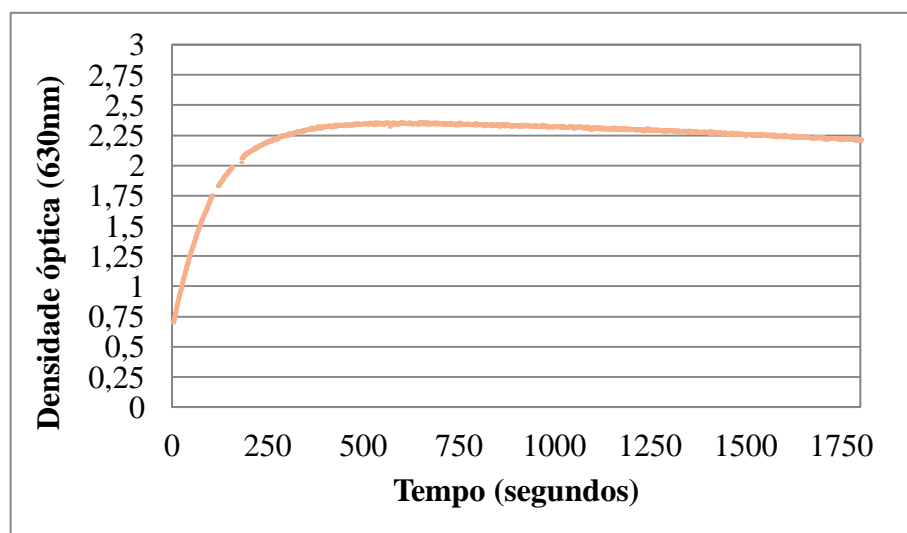
Um outro constituinte utilizado foi a albumina, que é caracterizada por ser uma proteína transportadora multifuncional (66,7 KDa), que constitui cerca de 60% do conteúdo total plasmático. A função basilar desta proteína consiste no transporte de diversas substâncias (endógenas ou xenobióticas) pela corrente sanguínea, através de ligações reversíveis (Kratz, 2008). Neste sentido, e com vista à tentativa de comprovar a hipótese de haver a possibilidade de ocorrer uma ligação dos novos derivados de insulina nitrosilados à albumina (de forma a promover o transporte destes compostos pela corrente sanguínea até às células-alvo) e com vista à aplicabilidade terapêutica de um dos péptidos nitrosilados biologicamente ativos (como será possível verificar nos resultados obtidos pela determinação do potencial terapêutico dos nitrosilados, produzidos em laboratório, através das células de músculo-esquelético de rato), recorreu-se à adição da albumina à mistura reacional, dado que a ação de determinadas proteínas está dependente da sua entrega ao local de ação respetivo.

Posteriormente, a insulina foi escolhida por três razões: primeiramente, por se tratar de uma hormona de especial importância por promover o estímulo da libertação de uma hormona putativa (HISS) por parte do fígado. Numa segunda instância, por se supor que produtos de degradação originados após a catálise enzimática da insulina por parte da PDI possam ter um potencial efeito a nível fisiológico (em especial porções da cadeia B). E, numa última instância, para determinar a presença/atividade da PDI possivelmente existente em hepatócitos, por se tratar de uma hormona polipeptídica constituída por duas cadeias de aminoácidos ligadas entre si por pontes dissulfito.

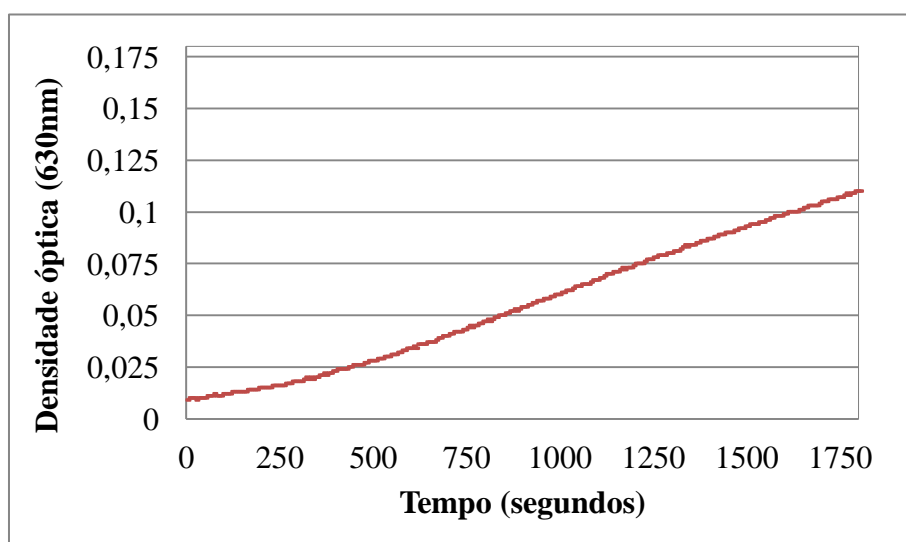
Por fim, como referido anteriormente, a proteína dissulfito isomerase purificada foi utilizada como enzima modelo para efetuar ensaios de turbidimetria padrão, de forma a obter cinéticas de reação que nos permitissem afirmar se nas amostras de lisados de fígado estaríamos na presença desta proteína, após a análise turbidimétrica da sua atividade de degradação enzimática sob a insulina.

#### **a)      Ensaio Padrão: Turbidimetria**

Finalizado o esclarecimento teórico do motivo da adição de cada constituinte, é possível passar à apresentação dos resultados obtidos após a realização da primeira experiência – “ 2.1.a) Catálise enzimática *in vitro* entre a PDI e a insulina - Ensaio Padrão: turbidimetria” – em que a PDI se encontrava a diferentes concentrações (2 mg/ml e 0,4 mg/ml).



**Gráfico 1** – Resultado do ensaio de turbidimetria da catálise enzimática levada a cabo pela PDI a 2 mg/ml.



**Gráfico 2** - Resultado do ensaio de turbidimetria da catálise enzimática levada a cabo pela PDI a 0,4 mg/ml.

Assim, através da observação dos gráficos 1 e 2 é legítimo constatar que concentrações diferentes de PDI estão associadas a diferentes resultados de turbidimetria, isto é, para concentrações de PDI na ordem dos 2 mg/ml é possível observar um aumento excessivo de densidade ótica até a um dado valor, a partir do qual apresenta um comportamento consideravelmente estável. O mesmo não se verificou para uma concentração de 0,4 mg/ml, sendo que a representação gráfica correspondente a este valor não apresentou grandes variações de densidade ótica, apesar de ser ter verificado um ligeiro aumento deste parâmetro com o passar do tempo, o que comprova

a existência de atividade da PDI mesmo em baixas concentrações. Neste sentido, é previsível que com concentrações mais baixas de PDI esta demore mais tempo a chegar patamar de estabilidade que se verificou no ensaio de turbidimetria da concentração mais elevada, o que consequentemente não inviabiliza a existência da mesma cinética de reação, pelo que precisaria de mais tempo de reação para o alcançar.

Com efeito, atendendo aos resultados obtidos foi então exequível adquirir a cinética de reação padrão da ação da PDI em função da insulina, tanto para concentrações elevadas desta enzima como para concentrações mais baixas. Este facto pode ser explicado atendendo ao fundamento teórico do ensaio de turbidimetria, que como referi no capítulo A, visa à determinação da quantidade de turvação de uma solução, com base a medição da turbidez após transmissão e dispersão da luz. Deste modo, aquando da transmissão de um feixe de luz através de uma amostra turva, ocorre diminuição da sua intensidade por dispersão da mesma, sendo que quanto maior for o tamanho dos agregados formados linearmente com o tempo ou quanto maior for a concentração destes em solução, maior será a dispersão de luz. Por conseguinte, com a técnica de turbidimetria torna-se possível avaliar o resultado de turbidez da amostra, por medição da densidade óptica correspondente à dispersão de luz a 680 nm, dado que nenhum dos componentes absorve a luz a este comprimento de onda (Hills & Tiffany, 1980).

Posto isto, e dada a natureza do ensaio desenvolvido, foi possível verificar que a proteína dissulfito isomerase (nas duas concentrações utilizadas) efetuou, de um modo linear, a clivagem das pontes dissulfito entre as cadeias A e B da insulina, através de redução das mesmas. E com o tempo, e após esta reação enzimática, as cadeias acabaram por se associar individualmente além de se associarem com a albumina. Facto este, é justificado pelas evidências de que as cadeias de insulina reduzidas têm tendência para polimerizarem, especialmente a cadeia B (devido à sua elevada hidrofobicidade), o que diminui a tendência de haver formação de isómeros AB da insulina dado à elevada disposição para auto-associação (Tang & Tsou, 1990). Para além deste pressuposto, foi ainda comprovado por Héber Silva em 2010 (comunicação pessoal – dados não publicados) através de estudos de *docking* computacional usando o programa Chimera, a propensão de haver ligação entre a cadeia A e cadeia B com a albumina.

Assim, a origem das curvas experimentais representadas nos gráficos 1 e 2 estão relacionadas com o processo de produção contínuo de cadeias A e B, que se acumulam em partículas de massa molecular crescente. Sabendo que a dispersão da luz depende de

$r^6$  ( $r$  - raio da partícula) podemos multiplicar uma variação linear de produto com o tempo por uma função de  $r^6$ , originando assim uma curva totalmente sobreponível com o registado experimentalmente.

Resumindo, e atendendo aos factos assinalados, é de concluir que com a redução das cadeias de insulina ocorre a formação de agregados, sendo que a sua cinética de formação é medida pela técnica de turbidimetria. Para além disso, a partir desta experiência foi possível constatar que a medida de turbidez da amostra depende consequentemente da concentração de PDI, dado que a atividade enzimática aumenta proporcionalmente com o aumento concentrações desta. Por fim, tendo em conta todos os fundamentos teóricos que alicerçam esta técnica e com base o que já se sabia quanto à função da PDI, foi então possível adquirir a cinética de reação padrão da catálise enzimática levada a cabo pela PDI em função da insulina, tanto para concentrações elevadas desta enzima como para concentrações mais baixas, o que torna então exequível a determinação da presença/atividade da PDI supostamente presente nos lisados de hepatócitos de rato Wistar, visto que esta última se trata de uma amostra biológica densa, onde existem numerosos componentes celulares.

## 1.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* ENTRE LISADOS DE HEPATÓCITO E A INSULINA

Subjacente ao primeiro objetivo estabelecido para a realização deste projeto de investigação – “(...) confirmar a existência de PDI nos hepatócitos, e determinar a sua atividade com recurso ao ensaio de turbidimetria (...)”, tornou-se essencial em primeiro lugar proceder à digestão *in vivo* do fígado de rato e de seguida à seleção e lise dos hepatócitos provenientes do órgão digerido para que fosse posteriormente possível cumprir com o objetivo determinado.

### a) **Digestão *in vivo* do fígado de rato Wistar e respetiva seleção e lise dos hepatócitos provenientes do fígado digerido**

Posto isto, os aspetos teóricos inerentes à digestão *in vivo* do fígado são explicados com base na utilização de diversos reagentes, nomeadamente: o tampão de Krebs-Henseleit (pH 7.4), o EGTA, a collagenase e por fim o cloreto de cálcio.

Deste modo, a utilização do tampão de Kresbs-Henseleit, (pH 7.4) no presente ensaio, teve duas finalidades: uma que dizia respeito à eliminação de células sanguíneas que eventualmente pudessem influenciar o desempenho da collagenase no processo

digestivo (através de uma lavagem dos vasos sanguíneos que fazem parte da constituição do fígado) e uma outra relacionada com a manutenção do tecido hepático.

Por sua vez, o EGTA foi empregue de forma a quelar os íons de cálcio, potencialmente presentes na água utilizada para a diluição do tampão supramencionado. Por fim, no que toca à colagenase, esta é uma protease comumente envolvida em reações de digestão de vários tecidos, nomeadamente do tecido hepático, sendo este o âmbito do seu uso na metodologia em discussão. No entanto, é importante salientar que para esta enzima exercer a sua atividade é necessária a presença de certos íons no meio, razão pela qual se procedeu à adição do cloreto de cálcio.

Cessada a digestão do fígado *in vivo*, tornou-se essencial proceder a uma preparação prévia das amostras para que fosse possível determinar a atividade da PDI potencialmente presente nos hepatócitos. Neste âmbito o primeiro passo consistiu na centrifugação das amostras resultantes da etapa anterior, o que possibilitou a separação dos hepatócitos dos demais constituintes e detritos celulares. Este passo apenas foi possível graças às características físicas, nomeadamente no que toca ao tamanho celular e densidade, demonstradas por estas células parênquimais (hepatócitos). Assim, após a obtenção do sedimento representativo das células de interesse procedeu-se a um conjunto de etapas nas quais foi necessário um misto de reagentes, entre os quais: o tampão de Krebs-Henseleit, o tampão de lise, o cocktail inibidor de proteases e ainda o triton X-100.

Por conseguinte, na presente etapa deste ensaio, a utilização do tampão de Krebs-Henseleit teve como intuito servir de veículo de lavagem do sedimento, de modo a promover a remoção dos diversos detritos e contaminantes celulares.

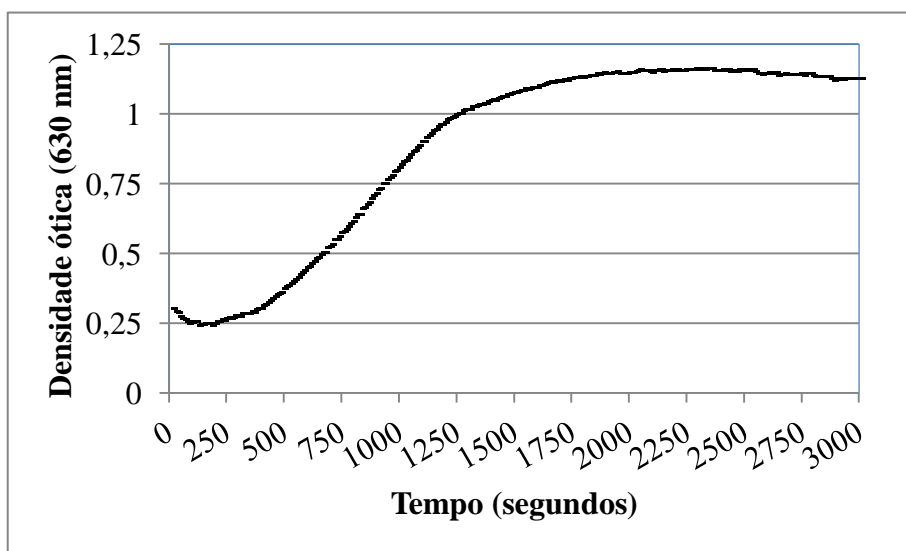
No que toca ao tampão de lise, este foi utilizado com a função de permitir a saída/extração dos componentes celulares através da lise da membrana celular dos hepatócitos.

Por sua vez, o cocktail inibidor de proteases tinha como papel fundamental a proteção da integridade das proteínas celulares durante o seu processo de extração. Neste contexto, é de salientar a suposta presença da nossa proteína de interesse, a PDI, pelo que este cuidado é vital para o sucesso da experiência.

Por último, o reagente utilizado no processo de extração proteica foi o triton X-100, o qual tem como finalidade coadjuvar a lise celular e promover a solubilização dos extratos proteicos daí provenientes.



Concluído todo o processamento necessário da amostra em estudo, tornou-se então possível proceder ao ensaio que permitiu cumprir com um dos objetivos determinados para o projeto de investigação em causa. Com efeito, efetuou-se a determinação da presença/atividade da PDI potencialmente existente na amostra em análise com recurso a um espectrofotómetro, a um comprimento de onda na ordem dos 630 nm, que após a leitura turbidimétrica foi possível obter como resultados da reação enzimática o gráfico 3, que se encontra abaixo apresentado.

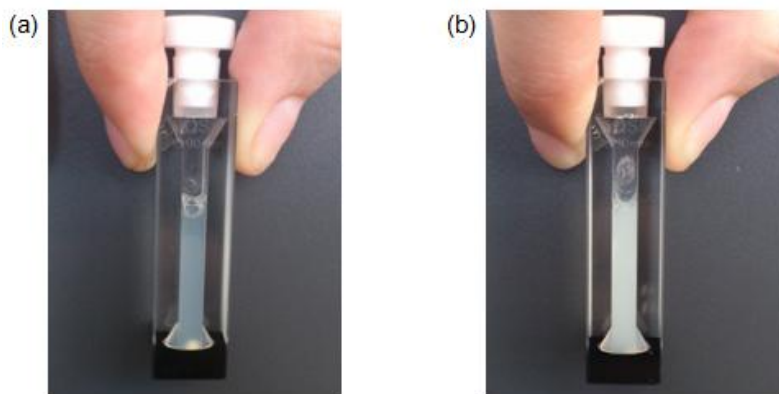


**Gráfico 3** – Resultado obtido após reação enzimática entre a PDI (proveniente de fígado de rato digerido com 50 mg de colagenase) e a insulina bovina (10 mg/ml), através da técnica de turbidimetria.

Assim, através da observação do gráfico 3 é possível constatar um aumento, embora pouco significativo, de densidade ótica até a um dado valor, a partir do qual apresenta um comportamento consideravelmente mais estável. Como tal, após esta análise é de concluir que a amostra analisada apresentou efetivamente uma cinética de reação bastante similar à observada no ensaio de catálise enzimática padrão da PDI anteriormente discutido, e em especial à reação realizada pela PDI em maior concentração (2 mg/ml) (apesar da reação ter ocorrido num período de tempo mais prolongado), pelo que se torna indiscutível a presença de PDI ao nível dos hepatócitos de rato Wistar. Contudo, é de salientar que a turbidimetria detetada não é resultante da PDI proveniente de apenas um hepatócito, mas de vários, o que por si só altera a perceção da reação que poderá ocorrer efetivamente numa só célula. Neste sentido, por analogia de concentrações a reação que possivelmente se detetaria num só hepatócito seria muito similar à reação obtida para concentração mais baixa da catálise enzimática

padrão discutida anteriormente (0,4 mg/ml). Desta forma, seria viável ter-se procedido à quantificação da PDI existente na amostra analisada. Adicionalmente, para complementar a comprovação de uma das conclusões retiradas desta experiência – existência de PDI no hepatócito – teria sido igualmente importante ter-se realizado, por técnica de imunoprecipitação, a determinação da existência desta proteína na célula, com recurso a anticorpos anti-PDI.

Todavia, apesar dos ensaios complementares que se poderiam ter realizado para satisfazer um melhor cumprimento do objetivo em causa, foi possível verificar que a PDI presente nas amostras examinadas efetuou, de um modo linear, a clivagem das pontes dissulfeto entre as cadeias A e B da insulina através da redução das mesmas, que com o tempo acabaram por se associar individualmente. Desta forma, e de modo a comprovar tal facto, adicionalmente ao resultado obtido através da leitura ótica, as imagens capturadas no instante inicial (figura 15 (a)) e final (figura 15 (b)) da catálise enzimática é mais uma evidência da ocorrência da redução de ambas as cadeias de insulina levada a cabo pela PDI, dado ser visível um aumento significativo de turvação entre os dois momentos da reação.



**Figura 15** - Interação *in vitro* entre a PDI proveniente do fígado digerido *in vivo* com recurso a 50mg de collagenase com a insulina. Assim, estas fotografias demonstram a aparência da suspensão relativa ao momento inicial da catálise enzimática (a) e ao momento final (após aproximadamente 1 hora). Através das imagens é visível um incontestável aumento de turvação entre o instante inicial e o final.

Em jeito de conclusão, atendendo aos ensaios padrão de catálise enzimática da PDI em função da insulina e ao ensaio de determinação da presença/atividade da PDI possivelmente existente nos hepatócitos, é possível corroborar e reforçar as ilações

feitas pelos demais autores quanto à presença de PDI ao nível destas células parênquimais do fígado, visto que de acordo com as amostras analisadas, foi demonstrada a sua atividade através da técnica de turbidimetria. Para além, de se ter demonstrado que esta proteína ao proceder à catálise enzimática da insulina origina produtos de degradação com potencial tendência a se auto-associarem (cadeia A e B reduzidas).

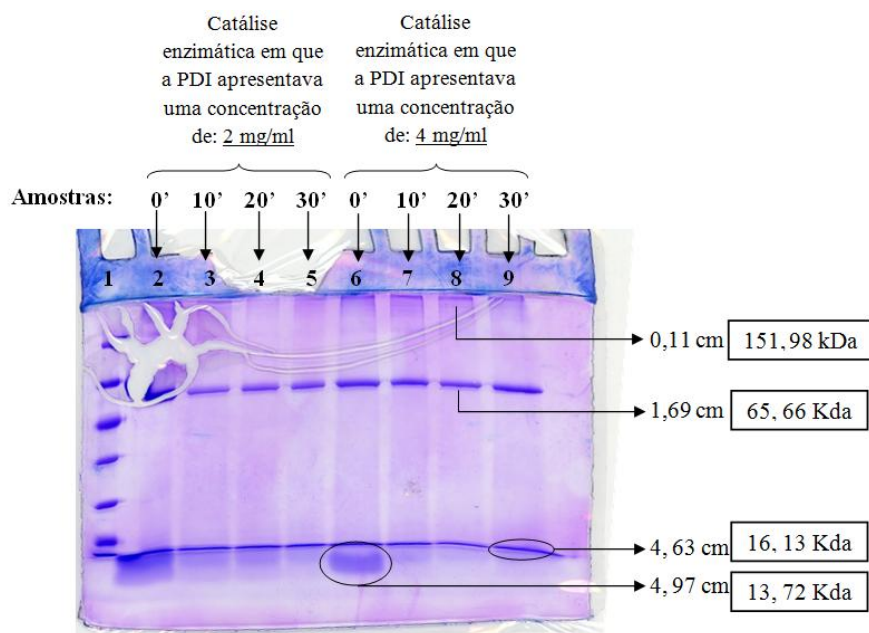
### **1.3. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ORIGINADOS PELA CATÁLISE ENZIMÁTICA**

No âmbito da determinação dos produtos de degradação resultantes do processamento enzimático da insulina, efetuado nas experiências “2.1.a) Catálise enzimática *in vitro* entre a PDI e a insulina - Ensaio Padrão: turbidimetria” e “2.1.b) Catálise enzimática *in vitro* entre a PDI e a insulina – Reação de longa duração (72 horas)”, procedeu-se, tal como referido anteriormente à utilização da técnica de eletroforese SDS-PAGE de modo a efetuar a análise das mais diversas amostras.

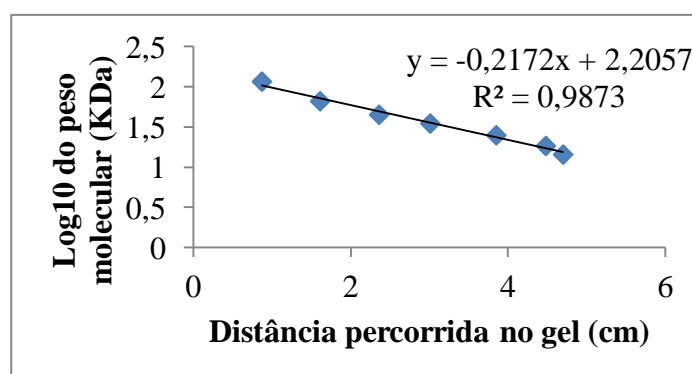
Neste contexto, torna-se relevante referir um fator chave para a compreensão dos resultados obtidos: o fundamento teórico desta técnica. Sendo assim, na separação por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, a migração dos polipéptidos é determinada não pela sua carga intrínseca mas pela sua massa molecular, visto que o dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente aniónico que envolve as proteínas de cargas negativas e procede à desnaturação das mesmas por conversão da estrutura nativa na sua estrutura linear (desnaturada).

#### **a) Análise das catálises enzimáticas cujas concentrações de PDI diferiam (2 mg/ml e 0,4 mg/ml)**

Posto isto, findada esta breve elucidação teórica da metodologia utilizada para a análise dos produtos de degradação originados após reação enzimática levada a cabo pela PDI sob a insulina, é então factível a análise dos resultados referentes à catálise enzimática *in vitro* entre a PDI e a insulina - ensaio padrão: turbidimetria (experiência 2.1.a)). Deste modo, na página seguinte, encontram-se indicados os resultados obtidos após a realização da eletroforese assim como as respetivas retas de calibração utilizadas para calcular os pesos moleculares das bandas existentes nos géis correspondentes às amostras.



**Figura 16** – Gel de SDS-PAGE relativo às amostras de concentrações diferentes de PDI, sendo que do poço 2 ao 5 a PDI encontrava-se numa concentração de 2 mg/ml, ao passo que do 6 ao 9 a sua concentração era de 0,4 mg/ml. 0': 0 minutos; 10': 10 minutos; 20': 20 minutos; 30': 30 minutos.



**Gráfico 4** – Representação gráfica do logaritmo de base de dez do peso molecular do marcador em função da distância percorrida no gel da figura 16.

**Tabela 6** – Dados, complementares ao gráfico 4, referentes à análise e tratamento do gel da figura 16.

Peso molecular do Padrão (KDa)	Log <sub>10</sub> do peso molecular padrão	Distância percorrida (cm)
116	2,06	0,87
66,2	1,82	1,61
45	1,65	2,36
35	1,54	3,01
25	1,39	3,85
18,4	1,26	4,48
14,4	1,15	4,7

**Tabela 7** – Dados referentes aos cálculos efetuados de acordo com a reta de calibração do gráfico 4.

<b>Distância percorrida pelas amostras</b>	<b>Log<sub>10</sub> do peso molecular das amostras</b>	<b>Peso molecular calculado</b>
<b>0,11</b>	2,18	151,98
<b>1,69</b>	1,81	65,66
<b>4,63</b>	1,20	16,13
<b>4,97</b>	1,13	13,72

Atendendo aos resultados obtidos é possível verificar que tanto para as amostras com PDI a 2 mg/ml como naquelas em que se procedeu à reação enzimática com PDI a 0,4 mg/ml, ocorreu uma diminuição da intensidade da última banda, localizada a 4, 97 cm do topo do gel, ao longo dos quatro tempos de cinética de reação escolhidos para análise. Concomitantemente a esta diminuição de intensidade da última banda, verificou-se também um aumento de intensidade de uma outra localizada a 4, 63 cm.

Assim, e como sugerido por Poole et al. (1982), supõe-se que o aumento da intensidade da segunda banda referida, esteja relacionada com o aumento da intensidade de um produto de degradação intermediário ou até mesmo final da catálise enzimática exercida. Neste contexto, na tentativa de decifrar de que composto se trata, após a análise do peso molecular resultante desta banda é perceptível que possa ter havido uma auto-associação da cadeia B da insulina, sendo que a hipotética associação de cinco cadeias B originaria um peso molecular correspondente a 16.5 KDa, tal como é visível na tabela 8. Além desta associação, existe uma outra possível que origina um peso molecular aproximado de 16 KDa: a existência de multímeros A e B associados entre si por pontes dissulfeto (3 cadeias B e 1 cadeia A (15.8 KDa) ou 4 cadeias A e 2 cadeias B (16,6 KDa)), ainda que esta associação seja menos provável de ocorrer quando comparada com a auto-associação de cadeias B, como demonstrado por Tang e Tsou (1990).

**Tabela 8** – Hipotéticas combinações entre as moléculas em estudo e os respectivos pesos moleculares.

		<b>Número de moléculas associadas</b>								
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Molécula</b>	<b>Ins</b>	5,8 KDa	11,6 KDa	17,4 KDa	23,2 KDa	29 KDa	34,8 KDa	40,6 KDa	46,4 KDa	52,2 KDa
	<b>Cad B</b>	3,3 KDa	6,6 KDa	9,9 KDa	13,2 KDa	<b>16,5 KDa</b>	19,8 KDa	23,1 KDa	26,4 KDa	29,7 KDa
	<b>Cad A</b>	2,5 KDa	5 KDa	7,5 KDa	10 KDa	12,5 KDa	15 KDa	17,5 KDa	20 KDa	22,5 KDa

Para além desta análise realizada, é importante ter em conta que os pesos moleculares correspondentes às bandas originadas pelas amostras não equivalem ao real peso molecular da albumina e da PDI. Contudo, este facto pode ser explicado pela fraca de precisão na medição das distâncias percorridas no gel, tanto para o marcador como para as amostras, pelo facto do gel se encontrar demasiado corado (que por sua vez não permite uma correta separação visual das bandas a albumina e PDI, demonstrando-se estas praticamente sobrepostas) e dado que se trata de um método laboratorial no qual estes erros são frequentes. Sendo assim, e por equivalência de pesos moleculares, consegue-se confirmar a existência de albumina e PDI nas amostras (tal com seria de esperar). Neste âmbito, é de destacar que esta ilação terá mais proeminência com a análise do gel de eletroforese relativo à experiência 2.1.b), o que consequentemente irá corroborá-la.

Como último ponto a merecer atenção na análise do gel surge a insulina intacta, existente no poço 2 e 6, que apenas se pode sugerir a sua presença como última banda, visto que nenhum peso molecular calculado corresponde aos 5.8 KDa.

Em jeito de conclusão, através da análise do gel representado na figura 16, é visível que ao longo do tempo ocorrem mudanças significativas ao nível da composição da mistura enzimática. Dado que através da visualização do gel, é possível afirmar a diminuição da quantidade de insulina e a consequente formação de um produto de degradação com o aumento do tempo de amostragem. Ou seja, na amostra correspondente aos zero minutos (poço 2 e 5) existe uma elevada concentração desta hormona, que com o aumento do tempo de exposição à reação enzimática realizada pela PDI (poços 3, 4, 6, 7 e 8), a sua concentração vai diminuindo para originar uma outra banda, banda esta que de acordo com o peso molecular calculado para a distância de 4.63 cm da figura 8, poderá hipoteticamente corresponder mais corretamente a uma auto-associação de cinco cadeias B.

#### **b) Reação enzimática de longa duração (72 horas)**

Para além da experiência anteriormente analisada, recorreu-se à catálise enzimática durante um período de 72 horas para posterior aplicação em gel de eletroforese SDS-PAGE. Como tal, este ensaio foi realizado com o intuito de comprovar o que anteriormente tinha sido proposto, visto que se procedeu à comparação entre o tempo em que ainda não tinha ocorrido qualquer degradação enzimática (0 minutos) e o tempo em que estaria completada toda a reação enzimática por redução das pontes dissulfeto da insulina (72 horas).

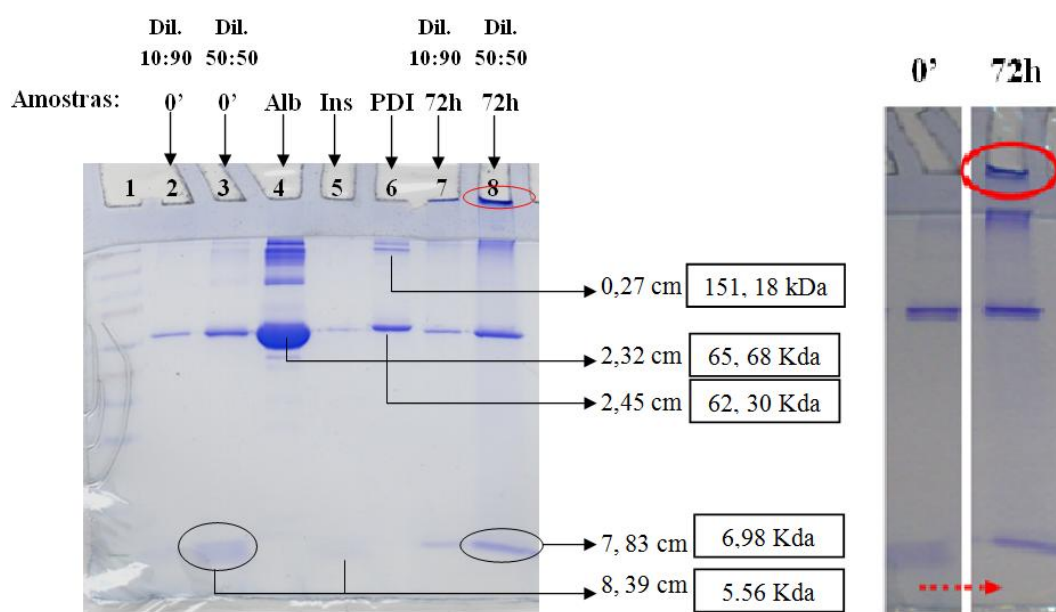
Posto isto, finalizado o ensaio enzimático realizado pela proteína dissulfeto isomerase durante 72 horas, a 37°C, foi possível obter a seguinte suspensão:



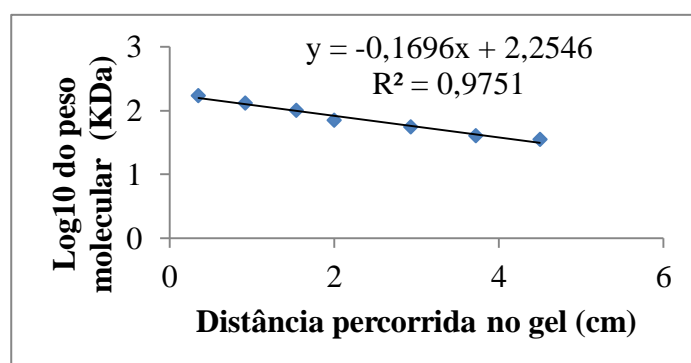
**Figura 17** - Resultado obtido após catálise enzimática efetuada pela PDI ao nível do seu substrato insulina, sendo possível a visualização da formação de precipitado.

Ao ser analisada a suspensão obtida, é possível verificar a presença de um precipitado no fim do recipiente no qual esta estava contida. Assim, tal como supracitado, este precipitado comprova a formação de agregados de partículas após redução das pontes dissulfeto da insulina por parte da PDI.

Posteriormente à obtenção deste resultado, as amostras, correspondentes ao minuto 0 e às 72 horas, foram tratadas e aplicadas em gel de eletroforese, que aquando do seu término, foi possível obter os seguintes resultados e respetivo tratamento de dados:



**Figura 18** - Gel de SDS-PAGE correspondente às amostras da reação enzimática realizada pela PDI (0,4 mg/ml) em relação à insulina durante 72 horas. Os poços 2 e 3 correspondem ao tempo de amostragem 0 minutos, já o poço 7 e 8 são pertencentes às amostras de 72 horas. Os poços 2 e 7 correspondem às amostras que foram submetidas a uma diluição 10:90, enquanto os poços 3 e 8 são relativos às amostras diluídas 50:50. Alb: Albumina; Ins: Insulina.



**Gráfico 5** – Representação gráfica do logaritmo da base de dez do peso molecular do marcador em função da distância percorrida no gel (figura 18).

**Tabela 9** - Dados, complementares ao gráfico 5, referentes à análise e tratamento do gel da figura 18.

<b>Peso molecular do Padrão (KDa)</b>	<b>Log<sub>10</sub> do peso molecular do padrão</b>	<b>Distância percorrida (cm)</b>
<b>170</b>	2,23	0,18
<b>130</b>	2,11	0,71
<b>100</b>	2,00	1,34
<b>70</b>	1,84	1,76
<b>55</b>	1,74	2,69
<b>40</b>	1,60	3,4
<b>35</b>	1,54	4,16
<b>25</b>	1,39	5,11
<b>15</b>	1,17	7,05
<b>10</b>	1,00	8,31

**Tabela 10** - Dados referentes aos cálculos efetuados de acordo com a reta de calibração do gráfico 5.

<b>Distância percorrida pelas amostras</b>	<b>Log<sub>10</sub> do peso molecular das amostras</b>	<b>Peso molecular calculado</b>
<b>0,27</b>	2,17	151,18
<b>2,32</b>	1,81	65,68
<b>2,45</b>	1,79	62,30
<b>7,83</b>	0,84	6,98
<b>8,39</b>	0,74	5,56

Tendo em conta os resultados obtidos através deste último gel (figura 18), e dada a natureza deste ensaio, é possível confirmar o que anteriormente foi referido relativamente aos produtos de degradação originados após a catálise enzimática da PDI



em função da insulina, visto que ao se analisar comparativamente as amostras correspondentes ao tempo 0 minutos (0') e ao tempo 72 horas (72h), é visível a presença de insulina intacta na amostra correspondente ao tempo 0' (8,39 cm) e a presença do produto de degradação na amostra correspondente às 72h de catálise enzimática (7,83 cm).

Esta conclusão foi possível ser construída de forma mais sólida dado que neste gel foi possível ter como meio de comparação a amostra de insulina pura no poço 5, a qual apresenta uma distância percorrida igual à distância percorrida pela amostra relativa ao tempo 0' de reação enzimática. Adicionalmente a este facto verificou-se, também, que esta banda apresenta um peso molecular aproximado de 5.56 KDa o que vai ao encontro do peso molecular da insulina (5.8 KDa).

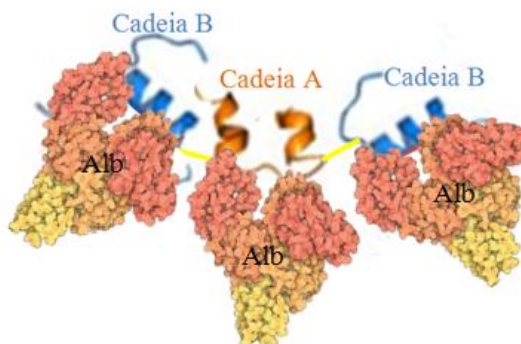
Relativamente à banda correspondente ao suposto produto de degradação é de ter em conta que esta apresenta um peso molecular de 6.98 KDa. O peso molecular obtido corresponde aproximadamente ao peso molecular de uma auto-associação de duas cadeias B (6.6 KDa), como é verificável na tabela 11, o que juntamente com os resultados obtidos para a experiência anterior (2.1.a)), comprova a existência dessas hipotéticas auto-associações.

**Tabela 11** - Hipotéticas combinações entre as moléculas em estudo e os respetivos pesos moleculares.

		Número de moléculas associadas								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Molécula	Ins	5,8 KDa	11,6 KDa	17,4 KDa	23,2 KDa	29 KDa	34,8 KDa	40,6 KDa	46,4 KDa	52,2 KDa
	Cad B	3,3 KDa	6,6 KDa	9,9 KDa	13,2 KDa	16,5 KDa	19,8 KDa	23,1 KDa	26,4 KDa	29,7 KDa
	Cad A	2,5 KDa	5 KDa	7,5 KDa	10 KDa	12,5 KDa	15 KDa	17,5 KDa	20 KDa	22,5 KDa

Além do que já foi referido, é ainda possível constatar a presença de um composto nos poços 7 e 8 que não chegou a penetrar no gel durante a corrida eletroforética, localizando-se por isso no topo de cada um desses poços. Este facto pode ser justificado à luz do que anteriormente foi mencionado quanto à suposta formação de ligações entre a cadeia A e cadeia B com a albumina. Assim, poderá ter ocorrido a formação de um polímero que seria constituído por cadeias A e B ligadas à albumina e ligadas entre si por pontes dissulfito (figura 19). Neste sentido, comparando o gel da experiência 2.1.a) e o gel da experiência 2.1b) é possível constatar que somente na reação de longa

duração foi permissível ocorrer a formação de tal composto de elevado peso molecular, visto que os constituintes da mistura reacional tiveram mais tempo de reagir uns com os outros após a ação redutora da PDI em relação à insulina.



**Figura 19** – Representação esquemática do possível polímero formado após a reação enzimática que decorreu durante 72 horas. Sendo que a albumina se encontra representada a vermelho, a cadeia A a cor de laranja, a cadeia B a azul e as pontes dissulfeto a amarelo.

Porém, como a banda da PDI e da albumina bovina estão praticamente sobrepostas em ambos os géis (facto demonstrado pela eletroforese de ambas as substâncias isoladas – poços 4 e 6), não é viável verificar se ocorreu alteração de intensidade da banda da albumina, pelo que não nos permite dar como certa a formação deste hipotético composto. Posto isto, é ainda de referir uma outra hipótese para a sua constituição, como é o caso não da formação do produto esquematizado na figura 19, mas de um outro de elevado peso molecular constituído por ligações dissulfeto entre múltiplos de cadeias A e B da insulina.

Em suma, com os resultados obtidos é possível confirmar a ocorrência da formação de produtos de degradação com o decorrer da catálise enzimática. Assim, ao ocorrer degradação da insulina por parte da PDI, surge consequentemente ao longo do tempo, uma diminuição da sua existência na mistura enzimática de forma a originar diversos produtos de degradação, podendo estes ser auto-associações de cadeias B, polímeros de cadeias A e B ligadas à albumina e ligados entre si por pontes dissulfeto ou ainda, múltiplos de cadeia A e B associados entre si por pontes dissulfeto. Posto isto, com os resultados obtidos nesta experiência é possível confirmar o que foi previamente proposto na eletroforese da experiência 2.1a) e ainda os fundamentos teóricos anteriormente referidos.

## **2. PRODUÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FISIOLÓGICO NO ÂMBITO TEORIA DA HISS**

Antes de passar à análise da última experiência em estudo, é essencial ter em conta quatro pressupostos teóricos, nomeadamente:

- Que a quebra de pontes dissulfito da insulina pela PDI pode estar envolvida em certos efeitos biológicos desta hormona (Duckworth et al., 1998);
- De que certos fragmentos da insulina (em especial a cadeia B) têm potencial efeito biológico (Duckworth et al., 1998);
- Que o óxido nítrico está envolvido na libertação da substância sensibilizadora da insulina (HISS) (Lautt, 2004; Afonso, 2011);
- E de que a hipótese deste projeto de investigação se baseia no facto de que a HISS possa consistir num dos produtos de degradação da insulina (cadeia A ou B reduzidas) nitrosilados.

Com efeito e atendendo aos pressupostos referidos, a segunda e última abordagem deste projeto de investigação propunha a produção de novos derivados de insulina nitrosilados e respetiva determinação do seu potencial terapêutico.

### **2.1 PRODUÇÃO DE NITROSILADOS DE INSULINA DE CADEIA ÚNICA**

#### **2.1.1. Mimetização da ação biológica da PDI através da separação química das cadeias de insulina.**

Assim, numa fase inicial foi necessário proceder à mimetização da ação biológica da PDI em relação à insulina, tendo-se recorrido, para tal, à redução das pontes dissulfito desta hormona por intermédio de uma reação química. Deste modo, para a realização desta primeira etapa foi imprescindível a utilização de diversos compostos, designadamente: EDTA, ureia, insulina bovina,  $\beta$ -mercaptoetanol e atmosfera de árgon.

Inerente à utilização destes compostos, torna-se essencial proceder à explicação da sua escolha. Assim, o EDTA, tal como referi anteriormente, é um agente quelante que forma complexos estáveis com vários iões, em especial os metais de transição. Por isso a sua utilização nesta reação química pode ser justificada pelo facto de impossibilitar a ligação de certos iões às cadeias de insulina, o que possivelmente originaria a formação de precipitados destas duas cadeias.

O segundo composto a ser utilizado foi a ureia, visto ser um agente desnaturante. Desta forma, com a sua adição à mistura reacional, promoveu-se a desnaturação da forma nativa da insulina com quebra das ligações hidrofóbicas inter e intracadeias.

De seguida, adicionou-se a insulina ao recipiente em que iria ocorrer a reação química, que tal como referi anteriormente teve o seu uso justificado pelo facto de ser a proteína em estudo no presente projeto de investigação devido à sua possível relevância para a libertação da HISS e dada a possível importância da cadeia A ou B da insulina a nível biológico.

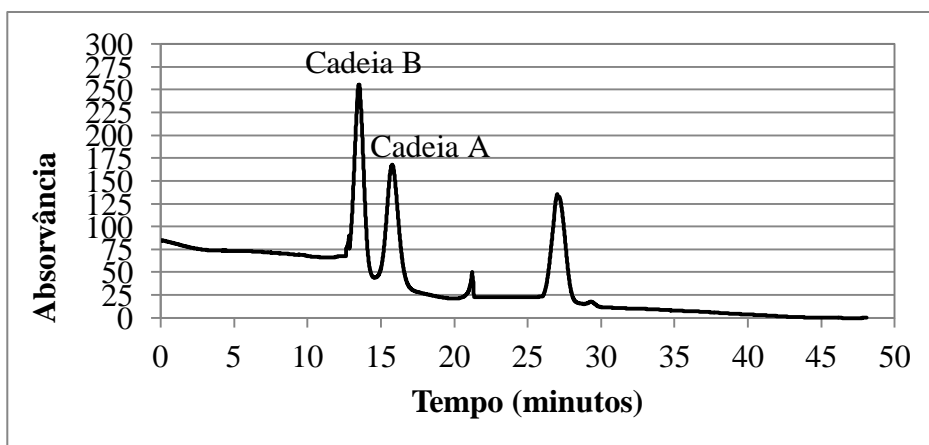
Posteriormente, recorreu-se ao uso de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) com vista à redução das pontes dissulfeto da insulina e respetiva produção de cadeia A e B isoladas.

Para além destes constituintes, utilizou-se ainda, uma atmosfera de árgon de modo a evitar a oxidação das cadeias A e B originadas após a reação do  $\beta$ -mercaptoetanol com a insulina.

Finalizada a reação química que impulsionou a presença de cadeia A e B da insulina isoladas, e com o objetivo de separar estas duas cadeias para dois recipientes distintos, recorreu-se ao uso da técnica de HPLC para a separação das mesmas.

Neste âmbito, é de ter em conta que o uso desta técnica apenas foi possível pelo facto destas duas cadeias apresentarem pesos moleculares distintos (e consequentemente tempos de retenção diferentes), e dado que todos outros constituintes da mistura reacional apresentam pesos moleculares bastante inferiores quando comparados com cada uma das cadeias isoladas.

Posto isto, visto que a cadeia A da insulina apresenta um peso molecular de aproximadamente 2.5 KDa e a cadeia B um peso molecular de 3.3 KDa, ocorreu o aparecimento de um primeiro pico no cromatograma, correspondente à cadeia B e um a seguir, e bastante próximo do primeiro, relacionado com a presença de cadeia A (Gráfico 6).



**Gráfico 6** – Resultado obtido após injeção de 20  $\mu$ l da reação química ocorrida para a separação da cadeia B (tempo de retenção: 12,46 minutos) e cadeia A (tempo de retenção: 14,9 minutos).

Subjacente ao que acabei de referir, com o aparecimento do primeiro pico relacionado com a cadeia B da insulina, tornou-se possível a sua extração, visto ser o primeiro componente da mistura reacional a sair pela coluna. De seguida, e seguindo a mesma lógica, recolheu-se a cadeia A.

### **2.1.2. Purificação da cadeia A e B da insulina pela técnica de HPLC**

Cessada a extração destas duas cadeias, foi então possível proceder à produção dos novos derivados de insulina por nitrosilação de ambas as cadeias. Assim inerente a esta terceira etapa, tornou-se necessário recorrer ao uso de uma panóplia de reagentes, entre eles: o EDTA, bicarbonato de sódio, GSH, nitrito de sódio e albumina.

Deste modo, o facto da possível presença de metais de transição em solução poder modificar, de certo modo, reações que envolvam óxido nítrico, justifica a utilização do EDTA nesta fase experimental.

No que toca ao bicarbonato de sódio, este foi utilizado com o intuito de levar à formação de produtos de potencial terapêutico com características o mais fisiológicas possível, dado que as amostras de cadeia A e B da insulina estavam inicialmente dissolvidas em ácido fórmico a 20%.

Outro constituinte a merecer destaque é o GSH, que apenas foi utilizado com o objetivo de reduzir as cadeias que possivelmente pudessem ter oxidado durante o manuseamento do HPLC.

O nitrito de sódio, por sua vez, foi utilizado de forma a servir como dador de  $\text{NO}^-$  à cadeia A ou B de insulina reduzidas, que posteriormente à reação das mesmas com o óxido nítrico originariam cadeias nitrosiladas.

Por fim, e tal como referido no início deste capítulo, no âmbito de uma aplicabilidade terapêutica destes novos derivados de insulina nitrosilados e da tentativa de comprovar que a HISS<sup>20</sup> não circula na corrente sanguínea *per se*, tornou-se necessário a adição de uma proteína transportadora à mistura reacional, visto que a ação de determinadas proteínas está dependente da sua entrega ao respetivo local de ação. Assim, subjacente ao facto da albumina ser uma proteína transportadora multifuncional procedeu-se à sua escolha como meio de transporte dos produtos originados após nitrosilação.

Posteriormente à produção destes compostos com potencial terapêutico ao nível da resistência à insulina, efetuou-se o envio dos mesmos para o Departamento de

---

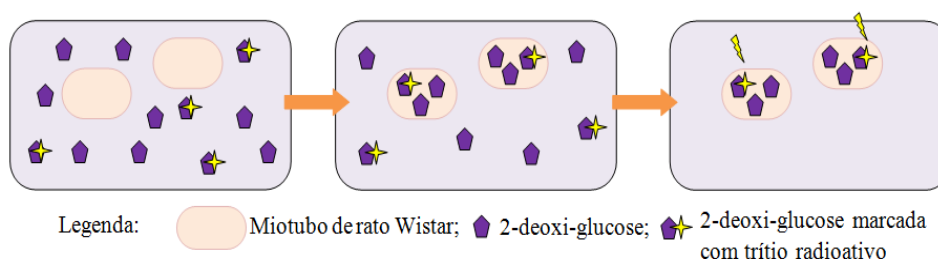
<sup>20</sup> De acordo com o projeto de investigação em causa, propôs-se que a HISS trata-se de um dos derivados de insulina nitrosilados produzidos em laboratório.

Fisiologia da FCM-UNL, para determinação do potencial terapêutico dos compostos produzidos *in vitro*, através da administração dos mesmos em miotubos de ratos Wistar e a ratos Wistar.

## 2.2. ADMINISTRAÇÃO DOS NITROSILADOS DE CADEIA A E B DA INSULINA A CÉLULAS DE MÚSCULO-ESQUELÉTICO DE RATO WISTAR

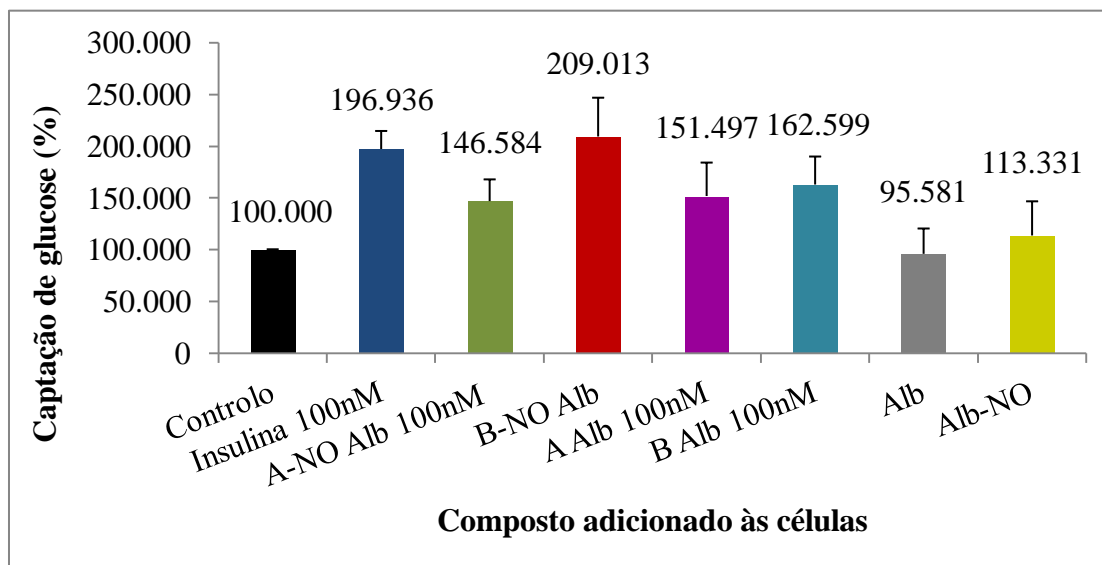
Neste âmbito e atendendo a que o músculo-esquelético, segundo a teoria da HISS, desempenha um papel crucial na manutenção da glicémia pós-prandial (por ser um potencial alvo de estimulação desta hormona putativa), tornou-se essencial averiguar o efeito dos novos derivados de insulina nitrosilados ao nível deste órgão. Como tal, com vista à realização deste estudo foi necessário recorrer a miotubos de rato como um sistema *in vitro* para averiguar a captação de glucose mediada por estes derivados, tendo-se procedido à monitorização de tal evento, através da medição do aumento de radioatividade levada a cabo pela 2-deoxi-glucose marcada com trítio radioativo (Yap, Nishiumi, Yoshida, Ashida, 2007).

Importa acrescentar ao referido que o método seguido para a determinação do potencial terapêutico dos produtos originados, baseia-se no facto da glucose e da 2-deoxi-glucose serem transportadas da mesma forma para dentro das células. Contudo, contrariamente à glucose, a 2-deoxi-glucose (2-DG) origina um metabolito secundário que não pode ser degradado, e como tal terá tendência a acumular-se intracelularmente (Yamamoto, 2011). Caso a 2-deoxi-glucose seja marcada radioactivamente, como se sucede no ensaio conduzido pela investigadora Dr.<sup>a</sup> Joana Gaspar, poderá tirar-se proveito do fundamento teórico atrás referido, e assim promover a acumulação de radioatividade a nível celular, a qual será proporcional ao estímulo de captação de glucose mediada pelo composto em estudo (figura 20).

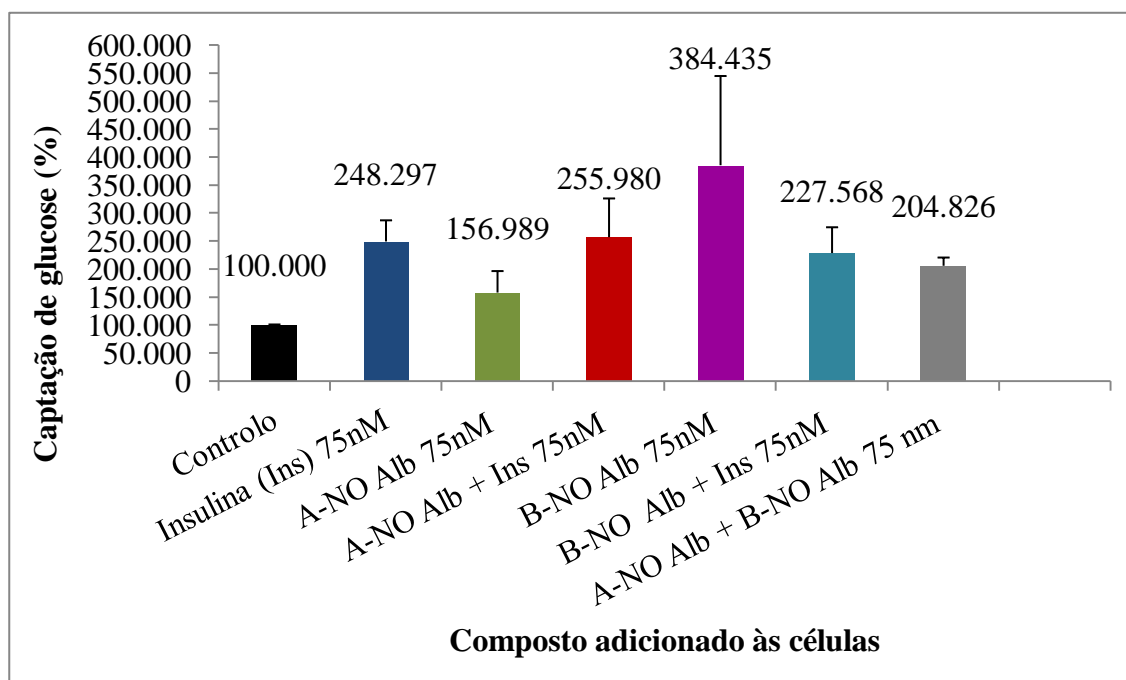


**Figura 20** – Esquematisação do processo da quantificação da captação de 2-DG pelas células em cultura. Inicialmente as células são colocadas num meio com as soluções teste e com 2-DG e 2-DG marcada com trítio radioativo; De seguida as células incorporam ambos os tipos de 2-DG; Por fim, as células são lavadas, lisadas e quantificada a radiação emitida, que corresponde à concentração de glucose incorporada.

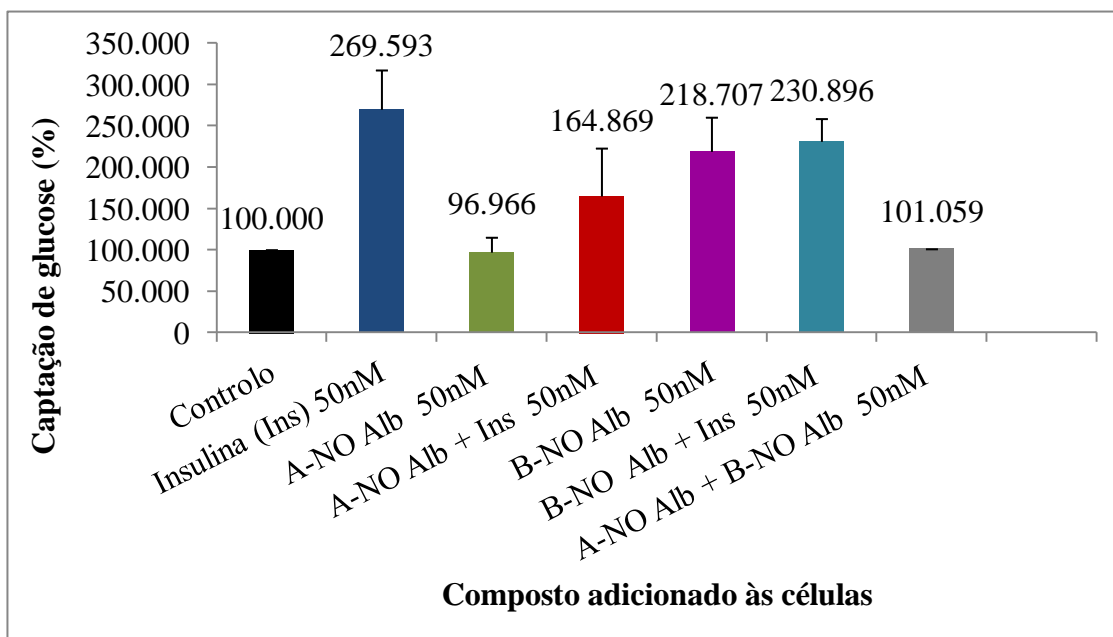
Posto isto, e aquando da finalização da experiência em causa, foi possível obter os resultados expressos nos gráficos 7, 8 e 9, abaixo apresentados.



**Gráfico 7** – Resultados obtidos pela investigadora Dr<sup>a</sup> Joana Gaspar (dados não publicados), após averiguação da captação de 2-deoxi-glucose por parte das células de músculo-esquelético de rato tratadas com 100 nM de insulina ou derivados de insulina nitrosilados ou albumina, e por parte de células não tratadas com qualquer composto (controlo).



**Gráfico 8** - Resultados obtidos pela investigadora Dr<sup>a</sup> Joana Gaspar (dados não publicados), após averiguação da captação de 2-deoxi-glucose por parte das células de músculo-esquelético de rato tratadas com 75 nM de insulina ou derivados de insulina nitrosilados ou ainda derivados de insulina mais insulina, e por parte de células não tratadas com qualquer composto (controlo).



**Gráfico 9** - Resultados obtidos pela investigadora Dr<sup>a</sup> Joana Gaspar (dados não publicados), após averiguação da captação de 2-deoxi-glucose por parte das células de músculo-esquelético de rato tratadas com 50 nM de insulina ou derivados de insulina nitrosilados ou ainda derivados de insulina mais insulina, e por parte de células não tratadas com qualquer composto (controlo).

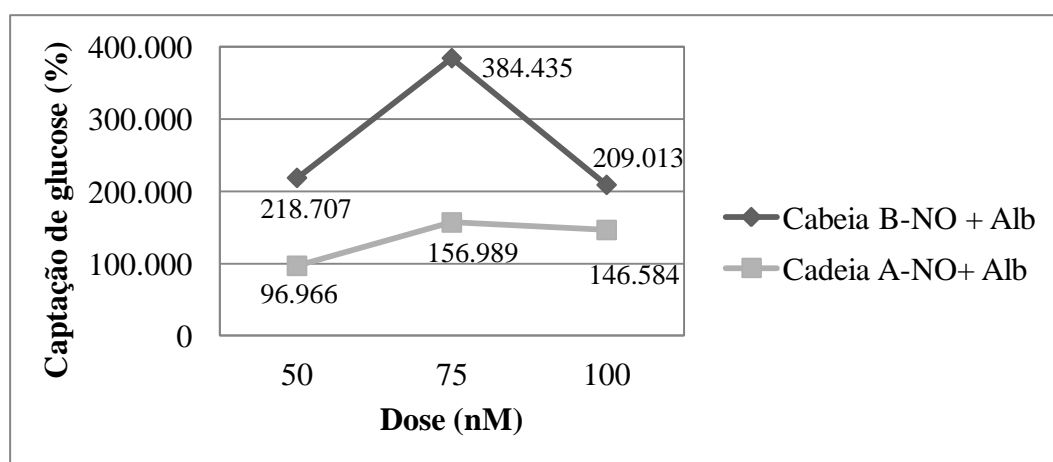
Posto isto, através da análise dos dados obtidos, foi possível constatar numa primeira instância, pelo gráfico 8, que as células tratadas com albumina apresentaram um aporte de 2-DG equivalente à cultura de células controlo ( $\pm 95.581\%$  versus  $100.000\%$ , respetivamente), pelo que é plausível concluir que esta proteína se apresenta como um componente inerte, e despromovido da atividade de interesse neste evento, facto este que já seria de esperar, especialmente porque se procedeu à sua adição aos derivados de insulina nitrosilados para apenas promover *a posteriori* o seu transporte na corrente sanguínea.

Por sua vez, as três componentes experimentais desta experiência, que encontram os seus dados representados nos gráficos 7, 8 e 9, permitiram constatar que a cadeia B nitrosilada (adicionada de albumina) apresentou um aumento significativo do aporte de 2-DG ( $\pm 209.013\%$ ;  $\pm 384.435\%$  e  $\pm 218.707\%$ ), quando comparado com as amostras controlo ( $100.000\%$ ) e com as amostras tratadas com os restantes derivados de insulina. Adicionalmente, é ainda de realçar a sua potenciação na captação de 2-DG quando comparada com a da insulina, que à exceção para a concentração de 50 nM (gráfico 9), foi possível verificar um aumento de  $\pm 12.077\%$  para uma concentração de 100 nM (gráfico 7) e de  $\pm 136.138\%$  para uma concentração de 75 nM (gráfico 8).



Contrariamente a cadeia A nitrosilada (adicionada de albumina) apresentou-se um composto de fraco interesse aquando da sua administrada isolada, visto que para além de ter demonstrado um efeito inferior à sua congénere cadeia A de insulina reduzida ( $\pm 146,584\%$  *versus*  $\pm 151,497\%$  (gráfico 7)), apresentou ainda efeitos significativamente inferiores aos da insulina ( $\pm 146,584\%$  (100nM);  $\pm 156,989\%$  (75 nM) e  $\pm 96,966\%$  (50 nM) *versus*  $\pm 196,936\%$  (100 nM);  $\pm 248,297\%$  (75 nM) e  $\pm 269,593\%$  (50 nM)) e aos da cadeia B nitrosilada (adicionada de albumina). Além de que para a concentração de 50 nM apresentou um valor ligeiramente inferior aos detetados para as amostras controlo ( $\pm 96,966\%$  *versus* 100.000% (gráfico 9)).

Ainda no contexto da administração de forma isolada destas duas cadeias de insulina nitrosiladas, tentou-se testar se a resposta biológica a estas duas moléculas era dependente de uma forma linear (ou gradual) das suas concentrações, mas tal não se verificou (gráfico 11), pelo que se sugere que o aporte de glucose celular mediado por estas moléculas parece estar relacionado com uma regulação muito fina, onde qualquer potencial sobreexpressão ou subexpressão de tais compostos a nível do organismo leva a uma diminuição do aporte de glucose.



**Gráfico 10** – Esquemática gráfica de dose-resposta da cadeia B nitrosilada adicionada de albumina e da cadeia A nitrosilada adicionada de albumina. B-NO: Cadeia B nitrosilada; A-NO: Cadeia A nitrosilada; Alb: Albumina.

Adicionalmente, à administração isolada dos nitrosilados de cadeia A e B de insulina procedeu-se igualmente à administração de ambos na presença de insulina, de forma a testar se a nossa hipótese proposta estaria correta. Assim, caso a hipótese de que um dos derivados de insulina nitrosilados seja a HISS se confirme, irá ocorrer um efeito cumulativo de 50% quando comparado com o efeito da insulina *per se*.

Atendendo aos resultados relativos aos efeitos demonstrados pelo nitrosilado de cadeia B de insulina, seria de esperar que este péptido fosse um potencial candidato à hormona que deu origem à teoria da HISS, dado este ter originado um aporte de 2-DG bastante superior à das células controlo e ainda uma estimulação superior à verificada para a insulina (para concentrações de 100 e 75 nM) e cadeia A nitrosilada.

Contudo tal não se sucedeu, visto que nem a cadeia B nitrosilada nem a cadeia A nitrosilada, adicionados de insulina, demonstraram o efeito cumulativo de 50%. Tendo-se então verificado para o nitrosilado de cadeia B adicionado de insulina uma diminuição de captação de 2-DG de  $\pm 20,729\%$  quando comparada com a insulina *per se*, para a concentração de 75 nM, e uma diminuição de  $\pm 38,697\%$  para a concentração de 50 nM. Em adição, surge o efeito cumulativo de  $\pm 7,683\%$  (gráfico 8 – 75nM) do nitrosilado de cadeia A adicionado de insulina e o decréscimo de  $\pm 104,724\%$  (gráfico 9 – 50nM) do aporte de 2-DG quando comparados com os valores de insulina isolada.

Desta forma, tais factos podem ser justificados à luz das seguintes suposições: ocorrência de competição entre as moléculas, com potencial diminuição da ligação da insulina ao recetor; ou potencial desvio dos nitrosilados de cadeias isoladas de insulina para a nitrosilação de proteínas-chave da via de sinalização da insulina, causando a inativação de algumas proteínas envolvidas na transdução de sinal do recetor desta hormona. Todavia, estas justificações não passam de puras suposições do que poderá ter ocorrido para se ter detetado um decréscimo do aporte de 2-DG nas células tratadas com estes compostos adicionados de insulina em comparação à insulina *per se*.

Por fim, como último ponto a merecer atenção, surgem os resultados obtidos para as células tratadas com nitrosilados de cadeia B e A concomitantemente ( $\pm 204,826\%$  (75 nM) e  $\pm 101,059\%$  (50 nM) (gráfico 8 e 9)), que no âmbito da investigação levada a cabo não apresentaram qualquer nível de significância quando comparados com os resultados obtidos para a insulina ( $\pm 248,297\%$  (75 nM) e  $\pm 269,593\%$  (50 nM) (gráfico 8 e 9)) e para a cadeia B nitrosilada ( $\pm 384,435\%$  (75 nM) e  $\pm 218,707\%$  (50 nM) (gráfico 8 e 9)). Apesar disso, no gráfico 8 detetou-se um valor de aporte de 2-DG superior para esta associação de compostos ( $\pm 204,826\%$ ) quando em comparação à cadeia A nitrosilada dos gráficos 8 e 9 ( $\pm 156,989\%$  e  $\pm 96,966\%$ , respectivamente). Neste sentido, importa então concluir, à semelhança do que foi mencionado anteriormente, a cadeia de insulina nitrosilada que apresenta potencial efeito terapêutico em casos de resistência à sensibilidade da insulina é a cadeia B nitrosilada, o que reforça os resultados obtidos para o efeito desta cadeia nitrosilada *per se*.

Em conclusão, apesar de não se ter detetado um efeito cumulativo de 50% aquando da administração da cadeia B nitrosilada em associação à insulina, esta demonstrou por si um composto de potencial interesse em casos de resistência à insulina. Pelo que, embora os dados retirados das células de músculo-esquelético de rato nos indiquem que este composto poderá não a ser a estrutura molecular da HISS, são necessários mais estudos para corroborar tal facto, visto que nesta experiência foi realizada a determinação da captação de 2-DG tendo apenas em conta um órgão em si e não o organismo como um todo.

### **2.3. ADMINISTRAÇÃO DOS NITROSILADOS DE CADEIA A E B DA INSULINA A RATOS WISTAR**

Como última experiência a merecer atenção nesta monografia, surge a administração dos nitrosilados de cadeia A e B da insulina a ratos Wistar, que apesar de se ter descrito a metodologia para tal realização, os resultados não vão ser aqui apresentados nem discutidos, visto que ainda se encontram a decorrer experiências neste âmbito. Contudo, de acordo com os resultados obtidos para as células de músculo-esquelético, é expectável que aquando da administração dos derivados de insulina nitrosilados se obtenha resultados similares, e como tal, um aumento significativo do aporte de glucose nos tecidos periféricos após a administração de cadeia B nitrosilada. Com efeito, com o aumento da captação de glucose aquando da administração deste composto, irá ocorrer durante os testes RIST um aumento do montante de glucose necessária a ser infundida para manter a euglicémia ideal do animal em estudo e por conseguinte, um índice de RIST bastante superior aos ratos controlo e aos tratados com os restantes derivados de insulina nitrosilados.

Já para os ratos tratados de acordo com o protocolo I, i.e. para os ratos tratados com derivados de insulina nitrosilados adicionados de insulina, os seus resultados de índice de RIST são possivelmente uma incógnita de conseguir efetuar uma previsão prévia, visto que contrariamente à experiência discutida no ponto 2.2 deste capítulo, testa-se neste ensaio a ação destes compostos adicionados de insulina no corpo humano e não apenas num órgão, o que torna tudo mais complexo e mais imprevisível de antever.

## **D. CONCLUSÕES**

Sem obstar as sucessivas considerações conclusivas que foram apresentadas nas várias secções da monografia, ao finaliza-la tem agora lugar uma sinopse reflexiva e conclusiva do que já foi trabalhado; assim, é possível afirmar que os objetivos subjacentes à hipótese inicialmente estabelecida foram alcançados. Desta forma, em primeiro lugar, as atividades laboratoriais realizadas permitiram reforçar as ilações feitas pelos demais autores quanto à presença e atividade da PDI ao nível dos hepatócitos, a qual foi confirmada pela técnica de turbidimetria. Foi ainda possível corroborar através desta técnica e da técnica de eletroforese a ocorrência da redução das pontes dissulfeto da insulina por parte da PDI e conseqüentemente a formação de produtos de degradação constituídos por cadeias A e B reduzidas. Por fim, e tendo em conta os diversos fundamentos teóricos envolvidos na teoria da HISS e na quebra de pontes dissulfeto da insulina, procedeu-se à síntese de nitrosotióis das cadeias isoladas da insulina para administração a células de músculo-esquelético de rato e a ratos Wistar. Após administração dos mesmos em miotubos de rato foi possível confirmar a suspeita inicial que um dos produtos de degradação de insulina tem potencial efeito terapêutico ao nível da resistência à insulina. Adicionalmente, tais resultados sugeriram também que contrariamente ao que se tinha proposto, a cadeia B nitrosilada não parece ser o candidato à hormona que deu origem à teoria da HISS, sendo porém necessários estudos que tenham em conta um organismo como um todo.

Concluindo, com a comprovação da aplicabilidade terapêutica da cadeia B nitrosilada, poderá ocorrer uma mudança substancial na abordagem terapêutica da resistência à insulina, com resultados bastante satisfatórios para a saúde dos pacientes portadores de patologias caracterizadas pela diminuição à sensibilidade desta hormona.

De forma a finalizar esta monografia, falta apenas mencionar algumas perspectivas futuras de novas experiências a serem realizadas. Neste sentido, no enquadramento da análise dos produtos de degradação da insulina, sugere-se a realização de espectrometria de massa e HPLC, visto serem técnicas mais precisas. Enquanto para a síntese de nitrosotióis propõe-se ensaios para avaliar a estabilidade de conservação dos produtos originados, nomeadamente através da técnica de DLS. Por último, na experimentação *ex vivo* e *in vivo* dos nitrosilados, sugere-se a sua administração futura a ratos não saudáveis, sendo de destacar ratos diabéticos, ratos obesos e ratos cuja alimentação é hipercalórica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., ... Khan, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409(6821), 729-733.
- Afonso, R. A. S. (2009). Sensibilidade à insulina pós-prandial: mecanismos fisiológicos de ativação e fisiopatologia na obesidade (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Afonso, R. A. (2011). The relevance of prandial state for peripheral insulin-dependent glucose uptake. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 2, 77-89.
- Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 23(4), 373-378.
- Ahrén, B. e Holst, J. J. (2001). The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes*, 50(5), 1030-1038.
- American Diabetes Association (2013a). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36(1), S67-74.
- American Diabetes Association (2013b). Standards of medical care in diabetes – 2013. *Diabetes Care*, 36(1), S11-S66.
- Anand, P. e Stamler, J. S. (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 90(3), 233-244.
- Appenzeller-Herzog, C. e Ellgaard, L. (2008). The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(4), 535-548.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. e Want, L. (2004). Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183-190.
- Ashcroft, F. M. e Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell*, 148(6), 1160-1171.
- Bano, G. (2013). Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 27(5), 715-726.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. e Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586-623.
- Bratanova-Tochkova, T. K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y. J., Mulvaney-Musa, J., ... Sharp, G. W. (2002). Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*, 51(1), S83-S90.
- Caperuto, L. C., Anhê, G. F., Cambiaghi, T. D., Akamine, E. H., do Carmo Buonfiglio, D. C., Cipolla-Neto, J., ... Bordin, S. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149(12), 6326-6335.
- Carvalho, J. B. C., Zecchin, H. G. e Saad, M. J. A. (2002). Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46(4), 419-425.

- Ceriello, A. e Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), 816-823.
- Chan, S. J. e Steiner, D. F. (2000). Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *American Zoologist*, 40(2), 213-222.
- Chen, C. L., Tsai, H. W. e Wong, S. S. (2010). Modeling the physiological glucose–insulin dynamic system on diabetics. *Journal of Theoretical Biology*, 265(3), 314-322.
- Choi, S. W., Benzie, I. F. F., Ma, S. W., Strain, J. J. e Hannigan, B. M. (2008). Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect?. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(7), 1217-1231.
- Cohen, P. (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 867-873.
- Correia, M., Neves-Petersen, M. T., Jeppesen, P. B., Gregersen, S. e Petersen, S. B. (2012). UV-light exposure of insulin: pharmaceutical implications upon covalent insulin dityrosine dimerization and disulphide bond photolysis. *Plos One*, 7(12), e50733.
- Correia, N. C., Guarino, M. P., Raposo, J. e Macedo, M. P. (2002). Hepatic guanylyl cyclase inhibition induces HISS-dependent insulin resistance. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 57-58.
- Cortez-Dias, N., Martins, S., Belo, A. e Fiuza, M. (2010). Prevalência, tratamento e controlo da diabetes mellitus e dos factores de risco associados nos cuidados de saúde primários em Portugal. *Rev. Port. Cardiol.*, 29(04), 509-537.
- Dodson, G. e Steiner, D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), 189-194.
- Duckworth, W. C. (1988). Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocrine Reviews*, 9(3), 319-345.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. e Hamel, F. G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Reviews*, 19(5), 608-624.
- Dunn, M. F. (2005). Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review. *Biometals*, 18(4), 295-303.
- Ekberg, K., Landau, B. R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H. e Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 48(2), 292-298.
- Ellgaard, L. e Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *Embo Reports*, 6(1), 28-32.
- Fawcett, J., Sang, H., Permana, P. A., Levy, J. L. e Duckworth, W. C. (2010). Insulin metabolism in human adipocytes from subcutaneous and visceral depots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(4), 762-766.
- Fernandes, A. B. A. (2011). Regulação integrada no metabolismo da glucose no estado pós-prandial: fisiologia e reversão de processos patológicos (Tese Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

- Fernandes, V. C., Denadai, Â. M. L., Millán, R. D. S., Alves, R. J. e Júnior, A. S. C. (2007). Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil- $\beta$ -ciclodextrina e insulina: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 543-553.
- Fernández-Real, J. M. e Pickup, J. C. (2012). Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 55(2), 273-278.
- Ferrannini, E. e Groop, L. C. (1989). Hepatic glucose production in insulin-resistant states. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 5(8), 711-726.
- Fonseca, V. A. (2007). Early identification and treatment of insulin resistance: impact on subsequent prediabetes and type 2 diabetes. *Clinical Cornerstone*, 8(7), S7-S18.
- Fonseca, V. A. (2009). Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(2), S151-S156.
- Forouhi, N. G. e Wareham, N. J. (2010). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, 38(11), 602-606.
- Gardete-Correia, L., Boavida, J. M., Raposo, J. F., Mesquita, A. C., Fona, C., Carvalho, R. e Massano-Cardoso, S. (2010). First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabetic Medicine*, 27(8), 879-881.
- Giugliano, D., Ceriello, A. e Esposito, K. (2008). Glucose metabolism and hyperglycemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 217S-222S.
- Goldstein, B. J. (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, 90(5), 3-10.
- Grayson, B. E., Seeley, R. J. e Sandoval, D. A. (2013). Wired on sugar: the role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 24-37.
- Gruber, C. W., Čemažar, M., Heras, B., Martin, J. L. e Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(8), 455-464.
- Guarino, M. P. e Macedo, M. P. (2006). Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *British Journal of Pharmacology*, 147(8), 959-965.
- Guarino, M. P., Afonso, R. A., Raimundo, N., Raposo, J. F. e Macedo, M. P. (2003). Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(4), G588-G594.
- Hale, L. J. e Coward, R. J. M. (2013). Insulin signalling to the kidney in health and disease. *Clinical Science*, 124(6), 351-370.
- He, A., Liu, X., Liu, L., Chang, Y. e Fang, F. (2007). How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin?. *Cellular Signalling*, 19(1), 1-7.
- He, L., Cao, J., Meng, S., Ma, A., Radovick, S. e Wondisford, F. E. (2013). Activation of basal gluconeogenesis by co-activator p300 maintains hepatic glycogen storage. *Molecular Endocrinology*, 27 (2), 1322-1332.
- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K. e Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 993-999.

- Hills, L. P. e Tiffany, T. O. (1980). Comparison of turbidimetric and light-scattering measurements of immunoglobulins by use of a centrifugal analyzer with absorbance and fluorescence/light scattering optics. *Clin. Chem.*, 26(10), 1459-1466.
- Hogg, N. (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1), 585-600.
- Jasuja, R., Passam, F. H., Kennedy, D. R., Kim, S. H., Hessem, L. V., Lin, L., ... Flaumenhaft, R. (2012). Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2104-2113.
- Joshi, S. R., Parikh, R. M. e Das, A. K. (2007). Insulin - history, biochemistry, physiology and pharmacology. *Journal of the Association of Physicians of India*, 55, 19-25.
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3-19.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., e Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840-846.
- Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., ... e Gerich, J. (1988). Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *Journal of Clinical Investigation*, 81(5), 1563-1571.
- Klover, P. J. e Mooney, R. A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), 753-758.
- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171-183.
- Lappi, A. K. e Ruddock, L. W. (2011). Reexamination of the role of interplay between glutathione and protein disulfide isomerase. *Journal of Molecular Biology*, 409(2), 238-249.
- Lasker, S. P., McLachlan, C. S., Wang, L., Ali, S. M. K. e Jelinek, H. F. (2010). Discovery, treatment and management of diabetes. *Journal of Diabetology*, 1, 1.
- Laurindo, F. R. M., Pescatore, L. A. e Fernandes, D. C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1954-1969.
- Lautt, W. W. (2003). Practice and principles of pharmacodynamic determination of HISS-dependent and HISS-independent insulin action: Methods to quantitate mechanisms of insulin resistance. *Medicinal Research Reviews*, 23(1), 1-14.
- Lautt, W. W. (2004). A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 95(1), 9-17.
- Lautt, W. W. (2007). Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 761-770.
- Lautt, W. W., Macedo, M. P., Sadri, P., Takayama, S., Ramos, F. D. e Legare, D. J. (2001). Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(1), G29-G36.
- Lautt, W. W., Wang, X., Sadri, P., Legare, D. J. e Macedo, M. P. (1998). Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(12), 1080-1086.



- Lawrence, J. C. (2005). Insulin and drugs used in the therapy of diabetes mellitus. In K. P. Minneman, L. Wecker, J. Larner e T. M. Brody (Eds), *Brody's human pharmacology : molecular to clinical* (pp. 443-456), 4ª Edição. Grã-Bretanha: Elsevier Mosby.
- Lopes, J. P., Oliveira, S. M. e Fortunato, J. S. (2008). Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas: relação com as complicações da diabetes mellitus tipo 2. *Acta Médica Portuguesa*, 21(3), 293-302.
- Maeda, R., Ado, K., Takeda, N. e Taniguchi, Y. (2007). Promotion of insulin aggregation by protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774(12), 1619-1627.
- Maggs, D., MacDonald, I. e Nauck, M. A. (2008). Glucose homeostasis and the gastrointestinal tract: insights into the treatment of diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10(1), 18-33.
- Martyn, J. A. J., Kaneki, M. e Yasuhara, S. (2008). Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology*, 109(1), 137-148.
- Meier, J. J., Holst, J. J., Schmidt, W. E. e Nauck, M. A. (2007). Reduction of hepatic insulin clearance after oral glucose ingestion is not mediated by glucagon-like peptide 1 or gastric inhibitory polypeptide in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 293(3), E849-E856.
- Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., ... Lawrence, M. C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 493(7431), 241-245.
- Meyer, C., Dostou, J. M., Welle, S. L. e Gerich, J. E. (2002). Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 282(2), E419-E427.
- Ming, Z. e Lutt, W. W. (2011). HISS, not insulin, causes vasodilation in response to administered insulin. *Journal of Applied Physiology*, 110(1), 60-68.
- Moore, P. A., Zgibor, J. C. e Dasanayake, A. P. (2003). Diabetes A growing epidemic of all ages. *The Journal of the American Dental Association*, 134(1), 11S-15S.
- Mora, M. E. V., Scarfone, A., Calvani, M., Greco, A. V. e Mingrone, G. (2003). Insulin clearance in obesity. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(6), 487-493.
- Narindrasorasak, S., Yao, P. e Sarkar, B. (2003). Protein disulfide isomerase, a multifunctional protein chaperone, shows copper-binding activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(2), 405-414.
- Nijima, A. (1989). Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration. *The Journal of Nutrition*, 119(6), 833-840.
- Nolan, C. J., Damm, P. e Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *The Lancet*, 378(9786), 169-181.
- Observatório Nacional da Diabetes (2013). *Diabetes: factos e números 2012 – relatório anual do observatório nacional da diabetes*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Disponível em: <http://www.spd.pt/imagens/ond2013.pdf>.
- Oka, O. B. V. e Bulleid, N. J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(11), 2425-2429.

- Okada, K., Hashimoto, S. e Imaoka, S. (2010). Biological functions of protein disulfide isomerase as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. *Journal of Health Science*, 56(1), 1-13.
- Pannerden, H. E. V. N., Dijk, S. M. V., Du, V. e Heijnen, H. F. G. (2009). Platelet protein disulfide isomerase is localized in the dense tubular system and does not become surface expressed after activation. *Blood*, 114(21), 4738-4740.
- Poole G., O'Connor K., Lazarus N. e Pogson C. (1982). I-labelled insulin degradation by isolated rat hepatocytes: the roles of glutathione-insulin transhydrogenase and insulin-specific protease. *Diabetologia*, 23(1), 49-53.
- Rains, J. L. e Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575.
- Rajpal, G., Schuiki, I., Liu, M., Volchuk, A. e Arvan, P. (2012). Action of protein disulfide isomerase on proinsulin exit from endoplasmic reticulum of pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 43-47.
- Raturi, A. e Mutus, B. (2007). Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 62-70.
- Raturi, A., Vacratsis, P. O., Seslija, D., Lee, L. e Mutus, B. (2005). A direct, continuous, sensitive assay for protein disulphide-isomerase based on fluorescence self-quenching. *Biochem. J.*, 391, 351-357.
- Rhodes, C. J. e White, M. F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(3), 3-13.
- Richardson, G. e Benjamin, N. (2002). Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clinical Science*, 102(1), 99-105.
- Robertson, R. P. (2006). Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(6), 615-619.
- Rocha, V. Z. e Libby, P. (2008). The multiple facets of the fat tissue. *Thyroid*, 18(2), 175-183.
- Roden, M. e Bernroider, E. (2003). Hepatic glucose metabolism in humans - its role in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17(3), 365-383.
- Roglic, G. e Unwin, N. (2010). Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(1), 15-19.
- Root, P., Sliskovic, I. e Mutus, B. (2004). Platelet cell-surface protein disulphide-isomerase mediated S-nitrosoglutathione consumption. *Biochem. J.*, 382, 575-580.
- Rorsman, P. (2005). Review: Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 5(4), 187-191.
- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Khamaisi, M. e Bashan, N. (1999). Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, 42(8), 949-957.
- Rutter, G. A. (2000). Diabetes: the importance of the liver. *Current Biology*, 10(20), R736-R738.
- Sadri, P., Legare, D. J., Takayama, S. e Lutt, W. W. (2003). Fetal ethanol exposure causes hepatic insulin sensitizing substance-dependent insulin resistance. *Canadian Journal of Diabetes*, 27(3), 239-247.

- Sadri, P., Reid, M. A. G., Afonso, R. A., Schafer, J., Legare, D. J., Macedo, M. P. e Lutt, W. W. (2006). Meal-induced insulin sensitization in conscious and anaesthetized rat models comparing liquid mixed meal with glucose and sucrose. *British Journal of Nutrition*, 95(2), 288-295.
- Saltiel, A. R. e Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806
- Santos, C., Afonso, R. A., Guarino, M. P., Patarrão, R. S., Fernandes, A., Noronha, J. P., ... Caldeira, J. (2006). In vitro nitrosation of insulin A-and B-chains. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12(5), 331-338.
- Scheepers, A., Joost, H. G. e Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364-371.
- Shimazu, T. (1981). Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia*, 20(3), 343-356.
- Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171-176.
- Sicree, R. e Shaw, J. (2007). Type 2 diabetes: An epidemic or not, and why it is happening. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 1(2), 75-81.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D. e Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: III. Aplicação à insulina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1), 21-40.
- Skelin, M., Rupnik, M. e Cencič, A. (2010). Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex*, 27(2), 105-113.
- Smith, A. M., Chan, J., Oksenberg, D., Urfer, R., Wexler, D. S., Ow, A., ... Huang, S. G. (2004). A high-throughput turbidometric assay for screening inhibitors of protein disulfide isomerase activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(7), 614-620.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J. e Haeften, T. W. V. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Tang, J. G. e Tsou, C. L. (1990). The insulin A and B chains contain structural information for the formation of the native molecule. Studies with protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.*, 268(2), 429-435.
- Tantipolphan, R., Romeijn, S., Engelsman, J. D., Torosantucci, R., Rasmussen, T. e Jiskoot, W. (2010). Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(2), 195-202.
- Teff, K. L. (2008). Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32(5), 569-571.
- Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H. O., Stockert, R. J. e Schilsky, M. L. (1995). Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20410-20416.
- Tfayli, H. e Arslanian, S. (2009). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in youth: the evolving chameleon. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(2), 165-174.

- Thorens, B. e Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141-E145.
- Tilg, H. e Moschen, A. R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Molecular Medicine*, 14(3-4), 222-231.
- Torres-Leal, F. L., Fonseca-Alaniz, M. H., Rogero, M. M. e Tirapegui, J. (2010). The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochemistry and Function*, 28(8), 623-631.
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F. e Ferraro, A. (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *Journal of Cellular Physiology*, 193(2), 154-163.
- Ward, C. W. e Lawrence, M. C. (2011). Landmarks in insulin research. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 76.
- Warnecke, A., Luessen, P., Sandmann, J., Ikic, M., Rossa, S., Gutzki, F. M., ... Tsikas, D. (2009). Application of a stable-isotope dilution technique to study the pharmacokinetics of human <sup>15</sup>N-labelled S-nitrosoalbumin in the rat: Possible mechanistic and biological implications. *Journal of Chromatography B*, 877(13), 1375-1387.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C. e Shaw, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311-321.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2), 19-39.
- Wilkinson, B. e Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1699(1), 35-44.
- Winter, J., Gleiter, S., Klappa, P. e Lilie, H. (2011). Protein disulfide isomerase isomerizes non-native disulfide bonds in human proinsulin independent of its peptide-binding activity. *Protein Science*, 20(3), 588-596.
- Wood, I. S. e Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89(01), 3-9.
- World Health Organization (2003). *Screening for type 2 diabetes: report of world health organization and international diabetes federation meeting*. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/68614>.
- Yamamoto, N., Ueda, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K. e Ashida, H. (2011) Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells, *Current Protocols in Pharmacology*, 55, 12.14.1-12.14.22.
- Yap, A., Nishiumi, S., Yoshida, K. e Ashida, H. (2007) Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives, *Cytotechnology*, 55, 103-108.
- Zhao, F. Q. e Keating, A. F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics*, 8(2), 113-128.
- Zimmet, P. (2003). The burden of type 2 diabetes: are we doing enough?. *Diabetes & Metabolism*, 29(4), 6S9-6S18.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. e Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782-787.